

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю
Кафедра біотехнології і мікробіології

«До захисту в ЕК»
Декан факультету
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (ім'я та прізвище)

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНИКОВ
(підпис) (ім'я та прізвище)

« » червня 2023 р.

« » червня 2023 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)
освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична,
промислова, харчова, природоохоронна»
на тему: «Одержання біомаси *Pseudomonas aureofaciens* для біодеградації
поліциклічних ароматичних вуглеводнів»

Виконав: здобувач IV курсу, групи 3

НЕГРЕТОВА Вікторія Василівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю) (підпис)

Керівник КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна
(прізвище, ім'я та по батькові повністю) (підпис)

Консультанти _____
(ім'я та прізвище) (підпис)
_____ (ім'я та прізвище) (підпис)

Рецензент Котинський А.В.
(ім'я та прізвище) (підпис)

Я, як здобувач(ка) Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавав(-ла) і не одержував(-ла) незарядженої допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь бакалавр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Біотехнології: фармацевтична
промислова, харчова, природоохоронна»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і
мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

“ ” 2023 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

НЕГРЕТОВОЇ Вікторії Василівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Одержання біомаси *Pseudomonas aureofaciens* для біодеградації
поліциклічних ароматичних вуглеводнів

керівник роботи КРАСІНЬКО Вікторія Олегівна, к.т.н., доц.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 28 березня 2023 року № 193-к

2. Строк подання здобувачем роботи 05.06.2023

3. Вихідні дані до роботи біологічний агент: *Pseudomonas aureofaciens*, цільовий
продукт: біомаса *Pseudomonas aureofaciens*, об'єм ферментера 5 м³, коефіцієнт
заповнення 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1.
Характеристика цільового продукту. РОЗДІЛ 2. Обґрунтування вибору та
характеристика біологічного агента. РОЗДІЛ 3. Біосинтез цільового продукту.
РОЗДІЛ 4. Обґрунтування вибору технологічної схеми. РОЗДІЛ 5. Специфікація
обладнання доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. РОЗДІЛ 6. Опис
технологічної схеми доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу. РОЗДІЛ
7. Контроль виробництва. РОЗДІЛ 8. Аналіз перспектив впровадження системи
екологізації виробництва. РОЗДІЛ 9. Нормативно-технічна документація,
використана під час проектування виробництва.

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема одержання біомаси *Pseudomonas aureofaciens* – 2 аркуші формату А1. Апаратурна схема одержання біомаси *Pseudomonas aureofaciens* – 1 аркуш формату А1.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 березня 2023 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Характеристика цільового продукту	01.03.2023 – 12.03.2023	
2	Обґрунтування вибору та характеристика біологічного агента	13.03.2023 – 26.03.2023	
3	Біосинтез цільового продукту	27.03.2023 – 02.04.2023	
4	Обґрунтування вибору технологічної схеми	03.04.2023 – 16.04.2023	
5	Специфікація обладнання	17.04.2023 – 03.05.2023	
6	Опис технологічної схеми одержання біомаси	04.05.2023 – 13.05.2023	
7	Контроль виробництва	14.05.2023 – 19.05.2023	
8	Аналіз перспектив впровадження системи екологізації виробництва	20.05.2023 – 25.05.2023	
9	Оформлення пояснювальної записки	26.05.2023 – 31.05.2023	
10	Виконання графічної частини проекту	26.05.2023 – 31.05.2023	

Здобувач _____
(підпис)

Керівник роботи _____
(підпис)

Вікторія НЕГРЕТОВА _____
(ім'я та прізвище)

Вікторія КРАСІНЬКО _____
(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем одержання біомаси *Pseudomonas aureofaciens* для біодеградації поліциклічних ароматичних вуглеводнів. Цей мікроорганізм порівняно з іншими здатний біодеградувати найбільший відсоток нафталіну (98,6 %) з забрудненого середовища за найменшу кількість часу (21 год).

Особливістю процесу є використання нафталіну у складі поживного середовища для стимуляції ферментативних систем, відповідальних за біодеградацію поліциклічних ароматичних вуглеводнів. Технологія виробництва біомаси включає ряд стандартних допоміжних робіт (підготовка стерильного аераційного повітря, приготування 6%-ного розчину соляної кислоти з метою підкислення середовища для його стерилізації, приготування та стерилізація 6%-ного розчину натрію гідроксиду для регуляції рН перед внесенням посівного матеріалу), а також такі допоміжні стадії, як приготування і стерилізація запасного розчину цитрату заліза (III) амонію та гексагідрату хлориду кальцію для культивування в колбах на качалках. Основний технологічний процес представлений чотирьома стадіями вирощування посівного матеріалу (у колбах на качалках, в інокуляторах об'ємами 6 л, 0,063 м³, 0,63 м³) та стадією виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6.

Кваліфікаційна робота викладена на 96 сторінках, містить 16 таблиць, 7 рисунків, складається зі вступу, дев'яти розділів, списку використаної літератури (47 найменувань), технологічної (формат А1, 2 аркуші) та апаратурної (формат А1, 1 аркуш) схем.

Ключові слова: *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501, біодеградація, поліциклічні ароматичні вуглеводні, нафталін, біомаса, інокулятор, виробничий біосинтез, консервування.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	9
РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА	12
2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування	12
2.2. Розрахунок складу поживного середовища	17
2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента	18
2.4. Таксономічний статус біологічного агента	20
РОЗДІЛ 3. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ	21
3.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента	21
3.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт.....	23
РОЗДІЛ 4. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ	29
4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу.....	29
4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера	29
4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря	32
4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів.....	33
4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища	39
4.2. Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту.	50
4.2.1. Вибір способу стабілізації культуральної рідини	51
Характеристика хімічних сполук, які можуть виступати консервантами:	53
4.2.2. Вибір способу фасування та упаковки для культуральної рідини	54
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.	57
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.	60
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА	72
7.1. Мікробіологічний контроль.....	72
7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту	73
7.2.1. Концентрація біомаси	73
7.2.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту.....	73

7.3. Карта постадійного контролю	75
РОЗДІЛ 8. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА	81
8.1. Системи знешкодження рідких відходів.....	81
8.1.1. Система очищення стічних вод	81
8.2. Системи знешкодження газоподібних відходів	82
8.2.1. Утилізація газоподібних відходів.....	83
8.3. Системи знешкодження твердих відходів	85
8.3.1. Утилізація твердих відходів	85
РОЗДІЛ 9. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА.....	86
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	88
ДОДАТКИ.....	93

ВСТУП

На сьогоднішній день в Україні гостро стоїть проблема забруднення ґрунтів та річок особливо стійкими до розкладання токсичними сполуками техногенного походження [1].

До забруднювачів цього класу відносяться такі органічні сполуки: нафта, нафтопродукти, поліциклічні ароматичні вуглеводні, пестициди [2].

Поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) є одними з найпоширеніших забруднювачів навколишнього середовища, що утворюються в результаті як природних, так і антропогенних процесів, і шкідливо впливають на фізіологічний стан усіх організмів, починаючи від бактерій і закінчуючи організмом людини, внаслідок мутагенності, тератогенності та канцерогенності. [3,4].

ПАВ наявні як природні компоненти у кам'яному вугіллі та нафті, формуються також внаслідок неповного згоряння органічних сполук, а тому знаходяться в досить високих концентраціях у продуктах переробки викопного палива. Стічні води металургійних і коксохімічних підприємств, деревообробної промисловості, газо- і нафтопереробних заводів, зливові води і аварійні виливи нафти є основними джерелами забруднення навколишнього середовища ПАВ. Вони виявлені в повітрі, ґрунтах, поверхневих і підземних водах, рослинах і тваринах, а також продуктах харчування.

Внаслідок антропогенного навантаження ароматичні вуглеводні постійно надходять у природне середовище і в результаті своєї надзвичайно високої стійкості накопичуються в ньому [4].

Для видалення поліциклічних ароматичних вуглеводнів з навколишнього середовища розроблено безліч стратегій, включаючи випаровування, фотоокислення, хімічне окислення, адсорбцію та біодеградацію. З перерахованих вище способів значної уваги набули методи біодеградації, особливо в контексті очищення забруднених ділянок, через їх порівняно низьку вартість.

					НУХТ БТЕК 04.03.27 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
<i>Розроб.</i>		Негретова В.В.			ВСТУП	<i>Літ.</i>	<i>Арк.</i>	<i>Акрушіє</i>
<i>Керівник</i>		Красінько В.О.					7	2 7
<i>Консультант</i>						Кафедра БТМ		
<i>Зав.каф.</i>		Стабніков В.В.						

Ефективні процеси біодеградації спрямовані на максимальне використання природного потенціалу мікроорганізмів щодо використання вуглеводнів [5].

Головними мінералізаторами органічної речовини є бактерії. Здатність швидко адаптуватися до нових умов навколишнього середовища, доволі широкий набір ферментних систем дають змогу їм використовувати різні органічні сполуки як джерело енергії та вуглецю і тим самим піддавати деструкції токсичні, канцерогенні та мутагенні речовини, до складу яких входять і ароматичні вуглеводні [4].

Мета кваліфікаційної роботи – проєктування ділянки доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу (технологічна та апаратурна схеми) біомаси бактерій *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501.

Новизною даної роботи є використання як біологічного агента бактеріального штаму *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501, який здатний розкласти 96% нафталіну за 21 годину з метою отримання біопрепарату для очищення ґрунтів від поліциклічних ароматичних вуглеводів.

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

Кінцевим продуктом біосинтезу бактерій *Pseudomonas aureofaciens* ВМК-2501, які застосовують для біодеградації поліциклічних ароматичних вуглеводнів, є біомаса, яка в подальшому буде використовуватися для виготовлення біопрепарату.

Поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) зображені на рис. 4.1. є великим класом дуже різноманітних органічних сполук, молекули яких складаються з трьох або більше ароматичних кілець, що утворюють різні конфігурації.

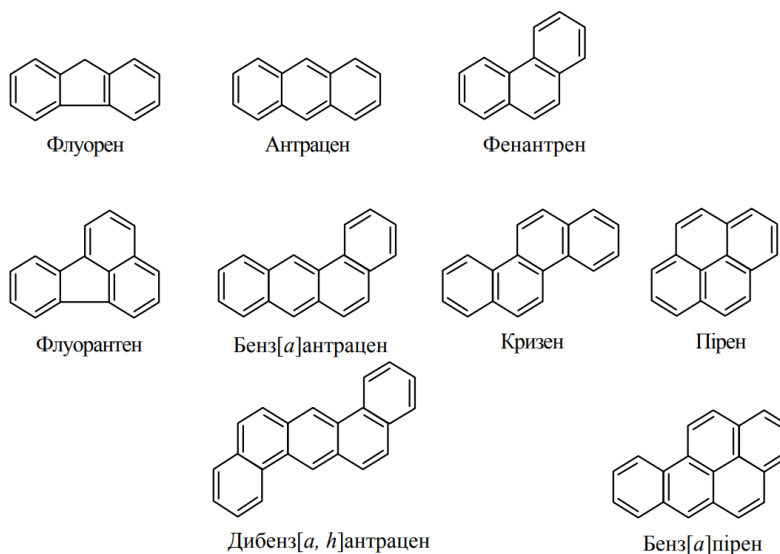


Рис. 1.1. Типові представники поліциклічних ароматичних вуглеводнів

На сьогодні відомо, що ці сполуки дуже поширені в навколишньому середовищі і шкідливо впливають на фізіологічний стан усіх організмів, починаючи від бактерій і закінчуючи організмом людини, внаслідок мутагенності, тератогенності та канцерогенності. ПАВ наявні як природні компоненти у кам'яному вугіллі та нафті, формуються також внаслідок неповного згоряння органічних сполук, а тому знаходяться в досить високих концентраціях у продуктах переробки вичерпаного палива. Стічні води металургійних і коксохімічних підприємств, деревообробної промисловості, газо- і нафтопереробних заводів, зливові води і аварійні виливи нафти є основними джерелами забруднення навколишнього середовища ПАВ.

					НУХТ БТЕК 04.03.27 КР ПЗ					
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ					
Розроб.		Негретова В.В.						Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Красінько В.О.							9	3
Консультант								Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.В.								

Вони виявлені в повітрі, ґрунтах, поверхневих і ґрунтових водах, рослинах і тваринах, у продуктах харчування [4].

Здатність розщеплювати такі сполуки з розривом ароматичного кільця притаманна багатьом бактеріям і грибам. Для розщеплення ароматичних сполук необхідна присутність молекулярного кисню. Поліциклічні сполуки спочатку деградують до ароматичних сполук. Більшість ароматичних сполук розщеплюється спочатку до пірокатехіну або до протокатехової кислоти, які піддаються діоксигенуванню [6].

Самоочищення ґрунту від ПАВ можливе за рахунок природних біотичних і абіотичних процесів їх трансформації, деградації і міграції. Основні з цих процесів:

- окислення ПАВ під впливом сонячного світла (фотоліз) і кисню повітря;
- хімічна дія, наприклад лугами;
- мікробіологічна деструкція (біодеградація) мікроорганізмами, які використовують ПАВ як джерело вуглецю;
- сорбція ґрунтом;
- поглинання коренями рослин;
- винесення з ґрунту водними потоками.

Можливе штучне очищення ґрунтів, забруднених ПАВ, шляхом окислення їх при опроміненні УФ-променями. Процес посилюється в присутності посилювачів, наприклад перекису водню [7].

Головними мінералізаторами органічної речовини є бактерії. Здатність швидко адаптуватися до нових умов навколишнього середовища, доволі широкий набір ферментних систем дають змогу їм використовувати різні органічні сполуки як джерело енергії та вуглецю і тим самим піддавати деструкції токсичні, канцерогенні та мутагенні речовини, до складу яких входять і ароматичні вуглеводні [4].

Цей процес є екологічно чистим, неінвазивним, економічно ефективним і стійким у порівнянні з фізичними та хімічними методами. Біодеградація може здійснюватися на ураженому місці (*in situ*) або в спеціально підготовленому місці (*ex situ*) і, отже, розглядатися як стійка альтернатива очищення, ніж звичайні фізико-хімічні методи [7].

При використанні мікроорганізмів відбувається швидка деградація ПАВ, а також захист рослин від токсичного впливу ПАВ та поліпшення зростання при вирощуванні за рахунок зниження вмісту поліциклічних ароматичних вуглеводнів в цих ґрунтах внаслідок біодеградації [1].

Серед різних мікроорганізмів для деградації поліциклічних ароматичних вуглеводнів, більшість з них мають здатність деградувати нафталін як єдине джерело вуглецю та енергії.

Нафталін є основним компонентом палива, текстильних барвників, споживчих товарів, пестицидів, пластифікаторів і соляріїв, отже, присутній в багатьох екосистемах.

Нафталін міститься у високих концентраціях у осаді річок, підземних водах і підповерхневих ґрунтах та руслах річок, що означає його біоаккумуляцію в навколишньому середовищі [7].

В останнє десятиліття розроблюють поліфункціональні біопрепарати, які не тільки пригнічують фітопатогенну мікрофлору, але й стимулюють ріст рослин, підвищують стійкість до стресів, а також мають вуглеводнево-окислювальну дію.

РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА

2.1. Обґрунтування вибору біологічного агента та поживного середовища для його культивування

На сьогоднішній день проблема забруднення навколишнього природного середовища нафтою і нафтопродуктами є дуже серйозною. В Україні виявлено багато районів із перевищенням гранично допустимих концентрацій нафтопродуктів не лише у воді, але і в ґрунтах (зокрема, в ґрунтах аеродромів, нафтобаз, нафтосховищ, нафтопереробних заводів, нафтових свердловин, автостоянок, автозаправок). У деяких регіонах забруднення стало вже настільки критичним, що нафтопродукти, які потрапили у ґрунти і підземні води, стали не лише отруйними, але й пожежонебезпечними.

Поліциклічні ароматичні вуглеводні у навколишньому середовищі можуть розкладатися головним чином бактеріями, водоростями, дріжджами та грибами [1].

Окрім *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501, відомі й інші штами, здатні біодеградувати нафталін, використовуючи його як єдине джерело вуглецю та енергії (табл. 2.1).

Дані, наведені у табл. 2.1, свідчать, що *Rhodococcus quinshengi* ТА13008 утворює найменшу кількість біомаси за найтривалішого культивування. Найбільшу кількість біомаси утворює *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 за 21 год. *Pseudomonas stutzeri* KOS6 та *Bacillus fusiformis* у свою чергу, відрізняються від вказаних вище штамів як за кількістю утвореної біомаси, так і за складом поживного середовища та умовами культивування. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента розраховуємо вартість поживних середовищ для культивування вибраних мікроорганізмів (табл. 2.2).

Як видно з даних, наведених у табл. 2.2, вартість поживного середовища для культивування *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 є середньою, але з точки зору ефективності впровадження такої екобіотехнології, коли саме швидкість і, головне,

					НУХТ БТЕК 04.03.27 КР ПЗ					
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА					
Розроб.	Негретова В.В.							Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник	Красінько В.О.								12	9
Консультант								12		
Зав.каф.	Стабніков В.В.				Кафедра БТМ					

повнота біодеградації є вирішальними факторами, іноді доводиться обирати дещо дорожчі, але набагато ефективніші екобіотехнології. У доступній науковій літературі відсутні методика вартісних розрахунків ефективності впровадження екобіотехнологій. Це пов'язано зі складністю і невизначеністю багатьох факторів, які мають бути взяті до уваги. Отже, зважаючи на більшу ефективність *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501, варто обрати саме цей мікроорганізм.

Для остаточного вибору найефективнішого біологічного агента розрахуємо умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 2.3). Дані, наведені у табл. 2.3, засвідчують, що умовна вартість біомаси, синтезованої штамом *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 є найнижчою (1,115 грн/г), а кількість утвореної біомаси за 1 год – найвищою (0,476 г/год).

Таблиця 2.1

Особливості одержання продуцентів, що біодеградують поліциклічні ароматичні вуглеводні на суміші ростових субстратів

Біологічний агент	Склад поживного середовища:		Тривалість культивування, год	Концентрація біомаси, г/л	Біодеградація ПАВ, %	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
	компонент	концентрація, г/л					
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> ВКМ В-2501	Нафталін Глюкоза трис NaCl KCl NH ₄ Cl Na ₂ SO ₄ MgCl ₂ ×6H ₂ O CaCl ₂ ×6H ₂ O Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O FeNH ₄ цитрат	1 2 6,06 4,68 1,49 1,07 0,43 0,2 0,03 0,23 0,005	21	10	98,6	pH 7 28°C	Патент №1
<i>Bacillus fusiformis</i>	Нафталін K ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaCl (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O CaCl ₂ ZnSO ₄ FeCl ₃ MnSO ₄ (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,5 1,0 1,0 5 0,3 0,3 0,02 5,0 2,3 5,0 1,0	96	0,47*	99,1	Культивування у колбах на качалці в темноті (t° = 30°C; n = 150 об/хв)	Chen Lin, Li Gan, Zu-Liang Chen Biodegradation of naphthalene by strain <i>Bacillus fusiformis</i> (BFN) <i>Journal of Hazardous Materials</i> , 2010: 771-777 doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.101

Закінчення табл. 2.1.

<i>Pseudomonas stutzeri</i> KOS6	Нафталін (NH ₄) ₂ SO ₄ MgSO ₄ ×7H ₂ O KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O вода дистильована	10 1,0 0,25 3,0 4,5 до 1 л	336	9,38*	27	pH - 7,2 30°C	Патент №2
<i>Rhodococcus quinshengi</i> TA13008	Нафталін MgSO ₄ CaCl ₂ K ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O KH ₂ PO ₄ NH ₄ NO ₃ FeCl ₃	0,01 0.2 0.02 1,0 1,0 1,0 0,05	432	0,0094*	100	Культивування у колбах об'ємом 250 мл з 100 мл середовища на качалці (t° = 37°C; n = 120 об/хв)	Assad AhmedAl-Thukair, Karim Malik, Alexis Nzila, Biodegradation of selected hydrocarbons by novel bacterial strains isolated from contaminated Arabian Gulf sediment, <i>Journal of Scientific reports</i> , 2010 doi:10.1038/s41598-020- 78733-0

Примітка. «*» – розраховано за вуглицем.

**Вартість поживного середовища для продуцентів, що біодеградують
поліциклічні ароматичні вуглеводні**

Продуцент	Компонент поживного середовища	Концентрація у ПС, г/л	Ціна компонента, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1 л середовища	Джерело інформації (1, 2, 3)*
1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> ВКМ В-2501	Нафталін	1	980	0,98	1
	Глюкоза	2	54	0,108	3
	трис	6,06	1646	9,975	1
	NaCl	4,68	5	0,0234	2
	KCl	1,49	15	0,02235	2
	NH ₄ Cl	1,07	9,66	0,01034	2
	Na ₂ SO ₄	0,43	32	0,01376	1
	MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,2	16	0,0032	2
	CaCl ₂ ×6H ₂ O	0,03	55,5	0,001665	3
	Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	0,23	51	0,01173	3
	FeNH ₄ цитрат	0,005	100	0,0005	1
Вартість 1 л середовища – 11,148 грн					
<i>Bacillus fusiformis</i>	Нафталін	0,5	980	0,49	1
	K ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1,0	132	0,132	1
	KH ₂ PO ₄	1,0	51,60	0,0516	1
	NaCl	5	5	0,025	2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3	15,60	0,00468	2
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,3	9	0,0027	2
	CaCl ₂	0,02	7	0,00014	2
	ZnSO ₄	5,0	43	0,215	1
	FeCl ₃	2,3	50	0,115	2
	MnSO ₄	5,0	19	0,095	2
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1,0	800	0,8	2
Вартість 1 л середовища – 1,931 грн					
<i>Pseudomonas stutzeri</i> KOS6	Нафталін	10	980	9,8	1
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0	15,60	0,0156	2
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,25	9	0,00225	2
	KH ₂ PO ₄	3,0	51,60	0,1548	1
	Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	4,5	51	0,2295	3
	вода дистильована	980,25	5	4,9	2
Вартість 1 л середовища – 15,102 грн					

Примітка. * – Ціни наведено станом на лютий 2022 р. 1 – <https://prom.ua/ua/>, 2 – www.kiev.flagma.ua, 3 – <https://www.systopt.com.ua>

**Умовна вартість одного грама біомаси синтезованої при біодеградації
поліциклічних ароматичних вуглеводнів**

Біологічний агент	Концентрація біомаси, г/л	Тривалість культивування, год	Кількість утвореної біомаси за годину, г/год	Вартість 1 л середовища, грн/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г
1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas aureofaciens</i> ВКМ В-2501	10	21	0,476	11,148	1,115
<i>Bacillus fusiformis</i>	0,47	96	0,0049	1,931	4,11
<i>Pseudomonas stutzeri</i> KOS6	9,38	336	0,028	15,102	1,61

2.2. Розрахунок складу поживного середовища

Розрахунок складу поживного середовища для вирощування прототрофного штаму *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 – біодеградатора нафталіну. Тривалість культивування 21 год, відсоток біодеградації поліциклічних ароматичних вуглеводнів в поживному середовищі – 98,6%, а концентрація біомаси – 10 г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела вуглецевого живлення.

Потреби для синтезу біомаси. Розрахуємо скільки вуглецю (за елементом С) міститься в 1 г нафталіну та 2 г глюкози. Молекулярна маса нафталіну ($C_{10}H_8$) становить 128, а глюкози ($C_6H_{12}O_6$) – 180. Отже, у 128 г нафталіну міститься 120 г Карбону, а в 180 г глюкози – 72 г, тоді в 3 г $((120+72) \times 3) / (128+180) = 1,87$ г Карбону.

Далі розраховуємо у скількох грамах нафталіну та глюкози міститься 1,87 г Карбону, враховуючи, що вміст Карбону у нафталіні становить 93,75 %, а в глюкозі – 40%. Отже, у 100 г нафталіну міститься 93,75 г Карбону, а у 100 г глюкози – 40г Карбону. Тоді 1,87 г Карбону міститься у $(1,87 \times 100) / 62,34 = 3$ г.

У біомасі міститься 50 % Карбону, отже вміст Карбону у 10 г біомаси становить $10 \times 0,5 = 5$ г. Ця кількість Карбону міститься у $(5 \times 100) / 62,34 = 8$ г вуглеводів.

У перерахунку на нафталін та глюкозу одержимо 12,8 г/л. Враховуючи 40% втрат субстрату на «холосте окислення», для одержання 10 г/л біомаси у середовище необхідно внести $(12,8 \times 0,4) + 3 = 8,12$ г/л.

Розрахунок вмісту в середовищі джерела азотного живлення.

Потреби для синтезу біомаси. Припустимо, що у біомасі міститься 10 % Нітрогену. Таким чином, у 10 г біомаси вміст азоту (за елементом N) становить 1 г.

Штам *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 асимілює як джерела азотного живлення мінеральний (амонійний) Нітроген. Для біодеградації нафталіну використовується середовище, яке містить як джерело мінерального Нітрогену: хлорид амонію NH_4Cl .

Розрахуємо кількість хлориду амонію, необхідну для одержання 10 г/л біомаси. Молекулярна маса NH_4Cl становить 53,5. Отже, у 53,5 г хлориду амонію міститься 14 г Нітрогену (N), тоді 0,094 г Нітрогену буде міститись у $(53,5 \times 1) / 14 = 3,82$ г солі.

Для одержання 10 г/л біомаси вміст NH_4Cl у середовищі культивування повинен становити 3,82 г/л.

2.3. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні ознаки біологічного агента

Бактерії *Pseudomonas aureofaciens* – це грамнегативні рухливі бактерії. Клітини поодинокі паличкоподібні, розміром $(0,6-0,9) \times (1,5-2,0)$ мкм.

Мають полярні джгутики – лофотрих. Спор не утворює. Кінці клітин заокруглені [8].

На м'ясо-пептонному агарі колонії круглі, гладкі, випуклі, блискучі, слизисті, жовто-помаранчевого кольору, однорідної структури. Пігмент зелений, з часом дифундує в середовище.

На LB – круглі, краї рівні, гладенькі, випуклі, блискучі, слизисті, жовто-помаранчевого кольору, діаметр 4-5 мм, пігмент жовто-помаранчевий, дифундує в середовище.

На триптозо-соевому агарі колонії крупні, інтенсивно забарвлені, спостерігається більш інтенсивна дифузія пігменту в середовище [9].

На середовищі Кінга А – колонії однорідні, коричнево-рожеві, слабо випуклі. Пігмент коричнево-жовтий [10].

На середовищі Кінга Б колонії жовто-зелені, пігмент інтенсивний, зелений, і з часом набуває жовто-помаранчевого кольору. З часом в середовищі утворюються помаранчеві кристали. В рідкому середовищі Кінг Б протягом доби утворюється сильна каламуть, осад, зелений пігмент, який на 4ту добу змінює колір на жовто-помаранчевий.

На середовищі М9 з нафталіном колонії круглі, слабо випуклі, непрозорі, світло-коричневі [9].

МПА (косяки) – штрих сірий, масляний, блискучий, слабо випуклий. Пігмент зелений, флуоресцентний у добових культур, потім стає золотисто-жовтим і коричнево-рожевий.

Картопляний агар (косяки) – ріст темно-коричневий, маслянистий, випуклий. Пігмент коричневий.

На м'ясопептонному бульйоні (МПБ) утворюється сильна каламуть, осадок, через добу росту пігмент зелений, флуоресцентний, що переходить на 3-5 добу в жовто-помаранчевий [10].

Прототроф – факторів росту не потребує. Не накопичує в клітинах полі- β -оксибутират. Желатину розріджує, молоко пептонізує, утворюючи зелений пігмент. Молекулярний азот не фіксує. Крохмаль не гідролізує. Пектиназна активність відсутня. Нітрати не редукує. Присутня аргініндигідролаза.

По відношення до кисню – облігатний аероб.

Оптимальна температура росту 28-30°C. Не росте при 37 °C.

Значення рН середовища: росте в межах 5,5-8,0. Оптимальне для росту 6,8-7,4.

Джерела вуглецю: глюкозу, фруктозу, трегалозу, маніт, гліцерин. Не засвоює арабінозу, ксилозу, рамнозу, галактозу, сорбозу, мальтозу, лактозу, адоніт, сорбіт, дульцит, інулін.

З органічних кислот засвоює оцтову, мурашину, молочну, бурштинову, фумарову, піровиноградну, яблочну, бензойну, саліцилову. Не засвоює винну, лимонну, щавлеву, глюконову кислоти.

Використовує як джерело вуглецю нафталін, фенантрен.

Джерело азоту – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , пептон, аланін, аргінін. Слабо засвоює KNO_3 , аспарагін, тирозин, сечовину.

Штам стійкий до антибіотиків: стрептоміцину (100 мкг/мл), триметоприму (100 мкг/мл), хлорамфеніколу (100 мкг/мл), карбеніциліну (1000 мкг/мл).

Чутливий до канаміцину (50 мкг/мл), гентаміцину (20 мкг/мл), тетрацикліну (20 мкг/мл).

Штам має базовий рівень хромосомної стійкості до цинку, кадмію та хромату. Максимальна толерантна концентрація (МТК) цинку - 1,5 мМ, кадмію - 0,2 мМ, хромату - 0,2 мМ.

Штам синтезує принципово специфічні продукти – гетероциклічні феназинові антибіотики (феназин-1-карбонову кислоту, 2-оксифеназин-1-карбонову кислоту і 2-оксифеназин), сидерофори, індоліл-3-оцтову кислоту (ІОК).

Штам бактерій стійкий до катіонів нікеля та кобальта. Максимальна толерантна концентрація (МТК) хлорида нікеля – 400 мкМ, хлорида кобальту – 200 мкМ [9].

2.4. Таксономічний статус біологічного агента

В 1-му виданні Визначника Бергі рід *Pseudomonas* був включений в порядок *Eubacteriales*, родину *Bacteriaceae*, трибу *Chromobacteriaceae*. Основна увага в описі роду була звернена на пігменти.

Автори 7-го видання Бергі помістили рід *Pseudomonas* разом з родами *Xanthomonas* і *Aeromonas* в родину *Pseudomonadaceae* [11].

За філогенетичною класифікацією згідно останнього Видання Бергі з систематики бактерій *P.aureofaciens* знаходиться:

Домен – *Bacteria*

Відділ – *Proteobacteria*

Клас – *Gammaproteobacteria*

Порядок – *Pseudomonadales*

Родина – *Pseudomonaceae*

Рід – *Pseudomonas*

Вид – *aureofaciens* [12].

РОЗДІЛ 3. БІОСИНТЕЗ ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ

3.1. Шляхи катаболізму ростового субстрату у біологічного агента

Джерелом вуглецю для бактерій виду *Pseudomonas aureofaciens* є нафталін [2].

Схему метаболізму нафталіну *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 у базі даних KEGG та статтях не наведено, проте є аналогічні схеми для схожого виду, для добре вивченого штама *Ps. putida* NBRC 14164. Тому можна припустити, що у *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 нафталін метаболізується таким же чином, як і у вищезгаданого штаму.

Згідно статті катаболізм нафталіну у *Ps. putida* NBRC 14164 відбувається таким чином: спочатку відбувається окиснення нафталіну до 1,2-дигідроксінафталін-1,2-діол під дією ферменту нафталін діоксигенази. Далі за допомогою цис-дигідродіол дегідрогенази 1,2-дигідроксінафталін-1,2-діол перетворюється в 1,2-дигідроксінафталін. Після чого остання сполука перетворюється в 2-гідроксихромен-2-карбоксилат при участі 1,2-дигідроксінафталін діоксигенази, Ферментативна дія 2-гідроксихромен-2-карбоксилата ізомерази на 2-гідроксихромен-2-карбоксилат зумовлює її перетворенню на транс-о-гідроксибензиліденпіруват. Далі транс-о-гідроксибензиліден піруват гідратаза-альдолаза перетворює транс-о-гідроксибензиліденпіруват в саліцилальдегід та піровиноградну кислоту. Після чого NAD-залежна саліцилальдегіддегідрогеназа перетворює саліцилальдегід в саліцилову кислоту. В свою чергу остання сполука перетворюється на катехол під дією саліцилат 1-гідроксилази.

Катехол розщеплюється через мета-маршрут катехолом 2,3-діоксигенази до 2-гідроксимуконічного напівальдегиду, який додатково гідролізується 2-гідроксимуконічним напівальдегідним гідролазом для отримання 2-гідроксипенти-2,4-дієноату. Наступні дії гідратази (2-оксопент-4-єноат гідратази) і альдолази (4-гідрокси-2-оксовалерат альдолази) перетворюють 2-гідроксипента-2,4-дієноат в піровиноградну кислоту і ацетальдегід, які потім спрямовуються в центральний

НУХТ БТЕК 04.03.27 КР ПЗ

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Негретова В.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Красінько В.О.				21	8
Консультант					21		
Зав.каф.		Стабніков В.В.			Кафедра БТМ		

**РОЗДІЛ 3. БІОСИНТЕЗ
ЦІЛЬОВОГО ПРОДУКТУ**

вуглецевий шлях.

Крім того, катехол розщеплюється кільцевим шляхом за допомогою катехолу-1,2-діоксигенази для отримання цис,цис-муконової кислоти. Муконат циклоізомераза, зіомераза муконолактону та β -кетoadипат енол-лактон гідролази перетворюють цис,цис-муконову кислоту в 3-оксоадипат, який потрапляє в центральні вуглецеві шляхи через сукциніл-КоА і ацетил-КоА [7].



Рис 3.1. Шлях катаболізму нафталіну у *Ps. putida* NBRC 14164

Ферменти: 1- нафталін діоксигеназа; 2 - цис-дигідродіол дегідрогеназа; 3, 1,2-дигідроксінафталін діоксигеназа; 4 - 2-гідроксихромен-2-карбоксилата ізомерази; 5-

транс-о-гідроксибензиліден піруват гідратаза-альдолаза; 6 - саліцилальдегіддегідрогеназа; 7 - саліцилат 1-гідроксилаза; 8 - катехол 2,3-діоксигеназа; 9 - 2-гідроксимуконічна напівлегігіддегідрогеназа; 10 - 2-оксопент-4-еноат гідратаза; 11 - 4-гідрокси-2-оксовалерат альдолази; 12 - ацетальдегіддегідрогеназа; 13 - катехол 1,2-діоксигеназа; 14 - мукоаналіз циклоізомераза; 15 - муконолактон дельта-ізомераза; 16 - β -кетoadипат енол-лактонний гідролаз; 17 - β -кетoadипат сукциніл-КоА трансфераза; 18 - β -кетoadипіл-КоА тіолаза; 19 - сукциніл-КоА:ацетил-КоА сукцинілтрансфераза.

3.2. Біотрансформація ростового субстрату у цільовий продукт

Цільовим продуктом біотрансформації ростового субстрату є біомаса бактерій *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501, яка в подальшому використовується для створення біопрепаратів, які використовують для біодеградування поліциклічних ароматичних вуглеводнів. Тому у даному випадку доцільно розглянути біогенез препаратів на основі біомаси мікроорганізмів, що включає синтез основних органічних сполук, які входять до складу мікробної клітини - нуклеїнових кислот, білків, полісахаридів та ліпідів.

На жаль, у Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes не представлено інформації стосовно *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501, тому розглянемо інший вид - *Ps. putida* NBRC 14164 [13].

Оскільки, обраний мною біологічний агент належить до прокаріотів, важливим є з'ясування, який тип за Грамом має мікроорганізм, тому, що до складу зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій входять ліпополісахариди, на відміну від грампозитивних бактерій, тому відповідно біосинтез компонентів клітинної стінки буде відмінним.

Бактерії *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 забарвлюються за Грамом негативно, тому можна стверджувати, що у складі клітинної стінки присутні ліпополісахариди [2].

При катаболізмі ростового субстрату (вище описано) нафталін перетворюється на ацетил-КоА.

Далі ацетил-КоА вступає у цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса). Реакції та ферменти циклу зазначені нижче.

За умов росту на нафталіні анаплеротичною послідовністю реакцій, яка поповнює втрати інтермедіатів ЦТК (C4 – дикарбонових кислот), є гліюксилатний цикл. Цей цикл називають також циклом Кребса-Корнберга. Ця анаплеротична послідовність реакцій здійснюється за участю двох ключових ферментів: ізоцитратліази та малатсинтази.

Під час росту на нафталіні доводиться синтезувати глюкозу та її похідні, які є необхідними для конструктивного метаболізму (біосинтезу полісахаридів, нуклеїнових кислот та ін.). Тому у мікроорганізмі функціонує гліюконеогенез, ключовим ферментом якого є фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (КФ 4.1.1.49).

Основні метаболіти-попередники для процесів конструктивного метаболізму утворюються як інтермедіати центральних метаболічних шляхів, до яких належать ЦТК, гліюліз (гліюконеогенез) та пентозофосфатний цикл.

Гліюкозо-6-фосфат утворений в результаті гліюконеогенезу залучається до пентозофосфатного циклу, в якому утворюються попередники біосинтезу родини ароматичних амінокислот та гістидину - еритрозо-4-фосфат та 5-фосфорибозил-1-пірофосфат відповідно. Окрім еритрозо-4-фосфату попередником фенілаланіну, тирозину та триптофану є ще ФЕП, що утворюється з оксалоацетату під дією фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (КФ 4.1.1.49) під час гліюконеогенезу [14].

Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват конденсуються під дією 3-дезоксисарабіногептулозо-7-фосфатсинтази (КФ 2.5.1.54) з утворенням 3-деокси-D-арабіногептулозонат-7-фосфату, який в свою чергу піддається циклізації. Проміжним продуктом синтезу нуклеїнових кислот є хоризмова кислота, саме у цій точці біосинтетичного шляху відбувається розгалуження і здійснюється синтез триптофану через антранілову кислоту, а також синтез тирозину і фенілаланіну через префенову кислоту під дією претирозиндегідрогенази (КФ 1.3.1.43) та префенатдегідратази (КФ 4.2.1.51) відповідно [15].

Амінокислоти аспартатної родини (аспартат, аспарагін, метіонін, треонін, ізолейцин та лізин) утворюються з оксалоацетату, який є інтермедіатом ЦТК. Біосинтез лізину відбувається через діамінопімеліновий шлях.

Піруват є попередником аланіну, валіну, лейцину, а 3-фосфо-D-гліцерат - серину, гліцину та цистеїну, що належать до піруватної родини амінокислот. Піруват утворюється з ФЕП за допомогою піруваткінази (КФ 2.7.1.40), а 3-фосфо-D-гліцерат – з 2-фосфо-D-гліцерату під дією ферменту 2,3-бісфосфогліцерат-незалежна фосфогліцерат-мутази (КФ 5.4.2.12).

Амінокислоти глутаматної родини (глутамат, глутамін, пролін, аргінін) утворюються з 2-оксоглутарату – проміжного продукту ЦТК.

Мономерами нуклеїнових кислот є нуклеотиди. Попередниками піримідинових нуклеотидів є карбамоїлфосфат та аспартат. Карбамоїлфосфат утворюється з NH_3 , CO_2 та двох молекул АТФ за участю ферменту карбамоїлфосфатсинтетази (КФ 6.3.5.5), а аспартат – з оксалоацетату шляхом трансамінування з глутаматом. Конденсація цих сполук дає карбамоїласпартат, який піддається циклізації і перетворюється на 4,5-дигідрооротат. Дегідрування цієї сполуки приводить до утворення оротату – першого проміжного продукту, який містить піримідинове кільце. Рибозо-5-фосфат, утворений у пентозофосфатному циклі, активується шляхом перетворення у 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. Реакція 5-фосфорибозил-1-пірофосфату з оротатом дає оротидинмонофосфат, який далі декарбоксилюється в уридинмонофосфат.

Синтез пуринових нуклеотидів відбувається у результаті метаболічного шляху, що починається з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату, з подальшим утворенням імідазольного нуклеотиду. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду, поступають з бікарбонату, аспартату та формілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає інозинмонофосфат (пуриновий нуклеотид, ІМФ). Декілька додаткових реакцій приводять від ІМФ до АМФ або до ГМФ, і нарешті утворюються АТФ та ГТФ.

Рибонуклеотиди відновлюються до дезоксирибонуклеотидів на рівні дифосфатів. В свою чергу фосфорилування дезоксинуклеозиддифосфатів за участю АТФ приводить до утворення відповідних трифосфатів [16].

В основному мембрани прокариот містять фосфо- та гліколіпіди, але оскільки *Pseudomonas aureofaciens* є грамнегативною бактерією, то у складі її клітинної стінки також наявні ліпополісахариди. Окрім вищезазначених компонентів до складу ліпідів входять жирні кислоти, які утворюються з ацетил-КоА шляхом певних перетворень (див. додаток 10). Попередниками синтезу фосфо- та гліколіпідів є фосфатидна кислота (діацил-3-фосфогліцерин), яка утворюється з ацил-АПБ і 3-фосфогліцерину двома етапами. Спочатку утворюється ацил-3-фосфогліцерин у результаті приєднання ацильної частини від ацил-АПБ до спиртової групи 3-фосфогліцерину під дією ферменту гліцерофосфатацилтрансферази. Потім інший аналогічний фермент ацилює С2-гідроксильну групу ацил-3-фосфогліцерину з утворенням діацил-3-фосфогліцерину. У свою чергу гліколіпіди синтезуються з фосфатидної кислоти також у два етапи. На першому етапі від молекули фосфатидної кислоти відщеплюється неорганічний фосфат (P_n). На другому етапі відбувається приєднання УДФ-глікозильного залишку [16].

До попередників ліпополісахариду клітинної стінки належить УДФ-галактоза, яка утворюється з глюкозо-6-фосфату. Другим попередником ліпополісахариду є гексозаміни, які утворюються з фруктозо-6-фосфату, який перетворюється в глюкозамін-6-фосфат: за рахунок глутаміна як донора аміногрупи. З глюкозамін-6-фосфату утворюються інші гексозаміни. Також для синтезу ліпополісахаридів необхідний ліпід А та 2-кето-3-дезоксиктонова кислота [14].

У бактерій в клітинній стінці присутній пептидоглікан, попередниками якого є УДФ-N-ацетилмурамова кислота та УДФ-N-ацетилглюкозамін, що синтезуються з глюкозамін-6-фосфату. Спочатку фосфатна група переноситься з положення 6 у положення 1 з утворенням глюкозамін-1-фосфату. Наступна реакція з ацетил-коА дає N-ацетилглюкозамін-1-фосфат, який зв'язується з УДФ. На останньому етапі УДФ-N-ацетилглюкозамін реагує з фосфоенолпіруватом, утворюючи УДФ-N-ацетилмурамову кислоту [16].

Ферменти: 1 – нафталін діоксигеназа; 2 – цис-дигідродіол дегідрогеназа; 3 – 1,2-дигідроксинафталін діоксигеназа; 4 – 2-гідроксихромен-2-карбоксилата ізомерази; 5 – транс-о-гідроксибензиліден піруват гідратаза-альдолаза; 6 – саліцилальдегіддегідрогеназа; 7 – саліцилат 1-гідроксилаза; 8 – катехол 2,3-діоксигеназа; 9 – 2-гідроксимуконічна напівлегігіддегідрогеназа; 10 – 2-оксопент-4-еноат гідратаза; 11 – 4-гідрокси-2-оксовалерат альдолази; 12 – ацетальдегіддегідрогеназа; 13 – катехол 1,2-діоксигеназа; 14 – мукоаналіз циклоізомераза; 15 – муконолактон дельта-ізомераза; 16 – β -кетoadипат енол-лактонний гідролаз; 17 – β -кетoadипат сукциніл-КоА трансфераза; 18 – β -кетoadипіл-КоА тіолаза; 19 – сукциніл-КоА:ацетил-КоА сукцинілтрансфераза; 20 – цитратсинтаза (КФ 2.3.3.1); 21 – аконітаза (КФ 4.2.1.3); 22 – ізоцитратліаза (КФ 4.1.3.1); 23 – малатсинтаза (КФ 2.3.3.9); 24 – ізоцитратдегідрогеназа (КФ 1.1.1.42); 25 – 2-оксоглутаратдегідрогеназа (КФ 1.2.4.2); 26 – сукцинаттіокіназа (КФ 6.2.1.5); 27 – сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.1); 28 – фумараза (КФ 4.2.1.2); 29 – малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37); 30 – фосфоенолпіруваткарбоксікіназа (КФ 4.1.1.49); 31 – енолаза (КФ 4.2.1.11); 32 – 2,3-бісфосфогліцерат-незалежна фосфогліцерат-мутаза (КФ 5.4.2.12); 33 – фосфогліцераткіназа (КФ 2.7.2.3); 34 – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (КФ 1.2.1.12); 35 – фруктозо-1,6-бісфосфат-альдолаза (КФ 4.1.2.13); 36 – тріозо-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.1); 37 – фруктозо-1,6-бісфосфатаза (КФ 3.1.3.11); 38 – глюкозо-6-фосфат ізомераза (КФ 5.3.1.9); 39 – фосфоглюкомутаза (КФ 5.4.2.2); 40 – піруваткінази (КФ 2.7.1.40) 41 – піруватдегідрогеназа (КФ 1.2.4.1); 42 – синтаза жирних кислот (КФ 2.3.1.86); 43 – ацетил-КоА-карбоксілаза (КФ 6.4.1.2); 44 – рибулозофосфат-3-епімераза (КФ 5.1.3.1); 45 – 3-дезоксисарабіногептулозо-7-фосфатсинтаза (КФ 2.5.1.54); 46 – претирозиндегідрогеназа (КФ 1.3.1.43); 47 – префенатдегідратаза (КФ 4.2.1.51); 48 – карбамоїлфосфатсинтетаза (КФ 6.3.5.5); 49 – аспартаткарбамоїлтрансфераза (КФ 2.1.3.2); 50 – дигідрооротаза (КФ 3.5.2.3); 51 – дигідрооротатдегідрогеназа (КФ 1.3.5.2); 52 – оротатфосфорибозилтрансфераза (КФ 2.4.2.10); 53 – оротидин-5-фосфат декарбоксілаза (КФ 4.1.1.23); 54 – 23-фосфогліцератдегідрогеназа (КФ 1.1.1.95); 55 – гліцерофосфатацилтрансфераза; 56 – діацилгліцерин-глікозил-трансфераза.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ

4.1. Обґрунтування доферментаційних процесів та виробничого біосинтезу

4.1.1. Обґрунтування способу культивування і типу ферментера

На вибір умов і способу культивування біологічного агента безпосередній вплив мають фізіолого-біохімічні ознаки. Штам *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 має наступні фізіолого-біохімічні ознаки:

1. По відношенню до кисню – облігатний аероб
2. Оптимальна температура культивування – 28 °С (мезофіл)
3. Оптимальне значення рН – 7 (нейтрофіл) [2].

Опрацювавши наукову літературу, було встановлено, що обраний біологічний агент володіє бактерицидними та фунгіцидними властивостями.

Це зумовлює потребу в умовно асептичних умовах під час біосинтезу, тому що існує потенційний ризик контамінації аналогічними безплазмідними штамми, що може знизити ефективність застосування готового біопрепарату. Асептичні умови забезпечують такими діями: стерилізацією обладнання та комунікацій, аераційного повітря, поживного середовища. Для попередження контамінації в ферментері створюється надлишковий тиск за допомогою подачі стерильного аераційного повітря.

В наявній науковій літературі відсутні дані стосовно можливості поверхневого культивування *Pseudomonas aureofaciens* для одержання біопрепаратів. До того ж за умов глибинного культивування спостерігається більша інтенсивність масообмінних процесів, отже доцільним є обрати саме глибинний спосіб культивування.

Він технічно більш досконалий, ніж поверхневий, оскільки легко піддається механізації і автоматизації. Крім цього, усі клітини культури знаходяться в однакових, легко відтворюваних умовах. В результаті вони рівномірно забезпечуються поживними речовинами і киснем. Глибинне культивування дає можливість чітко дозувати вміст у поживному середовищі різних компонентів [17].

НУХТ БТЕК 04.03.27 КР ПЗ

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Негретова В.В.			Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Красінько В.О.				29	28
Зав.каф.		Стабніков В.В.			Кафедра БТМ		
							29

**РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ
ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ
СХЕМИ**

Оскільки в даному поживному середовищі міститься невелика кількість джерела вуглецю та азоту, дробне підживлення не використовується.

Для забезпечення максимального відсотку біодеградації нафталіну в поживному середовищі бактеріями *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 обираємо періодичне культивування. Це пов'язано з тим, що при періодичному процесі використовуваний субстрат повністю споживається мікроорганізмом протягом усього часу культивування, в той час як при безперервному процесі ще неспожите середовище може вимиватися з ферментера, що є не вигідним для росту біологічного агента.

Обґрунтування типу ферментера для культивування *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 – біодеградатора нафталіну.

Конструкція та оснащення ферментера на пряму залежить від умов культивування біологічного агента, а саме :

1. температура культивування – 28 °С;
2. значення рН - 7;
3. аерації;
4. дотримання асептичних умов;
5. глибинне культивування без підживлення.

Визначившись зі способом культивування та фізіолого-біохімічними особливостями продуцента, обираємо необхідне оснащення для ферментера, яке б забезпечило створення даних умов.

Для культивування біологічного агента аеробні умови створюють за допомогою постійної подачі повітря барботером для здійснення аерації та перемішування культуральної рідини мішалкою. При цьому відбувається значно краще розчинення кисню за рахунок того що відбувається краще диспергування в середовищі. Також ферментер має бути оснащений газоаналізатором, для контролю концентрації CO₂, датчиком рН, щоб підтримувати постійне рН середовища, датчиком температури для контролю температури культивування та сорочкою для прискорення нагріву середовища.

Для інтенсивності масообмінних процесів та кращої гомогенізації культуральної рідини використовуємо перемішуючий пристрій з частотою обертів 150 – 200 об/хв [18].

Для культивування *P. aureofaciens* не передбачено встановлення перемішуючого пристрою певного типу та конструкції, тому обираємо доволіно пропелерну мішалку, оскільки вона має ряд переваг: здійснює інтенсивне перемішування культуральної рідини, є недороговартісною та здійснює помірну витрату енергії, навіть при значному числі обертів.

Для запобігання можливого піноутворення будемо використовувати механічний спосіб піногасіння, принцип дії якого полягає у встановленні мішалки у верхній частині апарата, яка по команді датчика буде обертатися і розбивати піну.

При опрацюванні інтернет-ресурсів було встановлено, що світові лідери з виробництва промислових біореакторів виготовляють ферментери об'ємом 5 м³ з коефіцієнтом заповнення 0,6 і пропелерною мішалкою лише під замовлення.

Тому щодо виробництва ферментера з заданими параметрами можна звернутися до фірми « Sysbiotech» (рис. 4.1.) (Австрія) [<https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-1000-5000l/>].



Рис. 4.1. Ферментер фірми Sysbiotech

Австрійська фірма випускає промислові ферментери об'ємом до 150 м³. У даних ферментерах передбачена універсальна система управління, яка дає змогу керувати за процесом за допомогою спеціальної програми.

Біореактор оснащений усіма необхідними для культивування датчиками – контролю рівня піни, рівня культуральної рідини, температури, рН, газоаналізатором, а також оснащений портом для відбору проб, мембранним манометром, сорочкою та іншим необхідним для контролювання процесу обладнанням.

В даному ферментері можна здійснювати автоматичне та ручне керування швидкості в залежності від кількості розчиненого кисню в діапазоні швидкостей 10-600 об/хв.

Також виробник даного обладнання забезпечує одну з головних умов при культивуванні – асептичні умови [19].

Отже, для проведення виробничого біосинтезу необхідно замовити виробництво ферментера, передбачити наявність барботера і датчиків контролю підтримки сталого значення рН, температури та газоаналізатора.

4.1.2. Обґрунтування вибору стадії підготовки аераційного повітря

Pseudomonas aureofaciens ВКМ В-2501 є облигатним аеробом, тому процес ферментації проходить за безперервної подачі стерильного аераційного повітря через барботер. Через це однією із найважливіших задач є одержання великої кількості стерильного повітря для аерації [2].

Для підготовки посівного матеріалу та інокуляту в приміщенні лабораторії та мікробіологічному боксі повітря стерилізують застосовуючи ультрафіолетове опромінення (УФ-лампи).

Підготовку стерильного стисненого аераційного повітря для біореакторів здійснюють наступним чином:

- атмосферне повітря забирають турбокомпресором через забірну шахту, на висоті 2- 3 м від найвищої точки будівлі, оскільки із збільшенням висоти над поверхнею концентрація мікроорганізмів у повітрі зменшується. Тож, забір атмосферного повітря здійснюватиметься на висоті 8 м;

- для звільнення повітря від грубого аерозолію – пилу, захисту компресорів від забруднення і зниження кількості контамінантів повітря очищають за допомогою фільтрів попереднього очищення;
- далі повітря піддають стисненню у турбокомпресорі до 0,35-0,5 МПа, щоб подолати опір фільтрувальних матеріалів на наступних стадіях фільтрування, а також подоланні гідравлічного опору під час диспергування повітря у об'ємі культуральної рідини, оскільки за даних умов відбувається нагрівання повітря до температури 120–200°C і збільшення вологовмісту на одиницю об'єму.
- для охолодження нагрітого під час стиснення повітря та видалення вологи у краплевловлювачі, повітря охолоджують за допомогою водяного теплообмінного апарату;
- для того, щоб остаточно видалити конденсовану вологу та вирівняти тиск повітря подають у ресивер;
- для очищення повітря, що подається до усіх ферментерів цеху і видалення до 98% мікроорганізмів очищення проводять на головних фільтрах, які заповнюються набивним волокном і встановлюються в цеху ферментації на головному повітряному колекторі стиснутого аераційного повітря;
- для остаточного очищення повітря перед ферментером встановлюється індивідуальний повітряний фільтр, який здатен затримувати 99,999% мікроорганізмів [20].

4.1.3. Вибір мийних та дезінфікуючих засобів

Виробництво по одержанню біомаси *Pseudomonas aureofaciens* здійснюється протягом 50 дні і передбачає підготовку такого обладнання: ферментер об'ємом 5 м³, посівні апарати об'ємом 6 л, 0,063 м³ та 0,63 м³, збірники для підготовки та стерилізації компонентів поживного середовища, качалки, бокс та лабораторне устаткування.

Виробництво продукту здійснюється в таких приміщеннях: цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту, мікробіологічна лабораторія в якій

знаходиться бокс, автоклав, термостат, холодильник, лабораторний посуд та інвентар, апаратура для проведення різноманітних видів контролю.

На *рис 4.2.* наведено приблизний план приміщення для по одержанню біомаси *Pseudomonas aureofaciens*. План враховує діаметри обладнання та відстань між ними (не менше 1м) і від стін (1...1,5м).

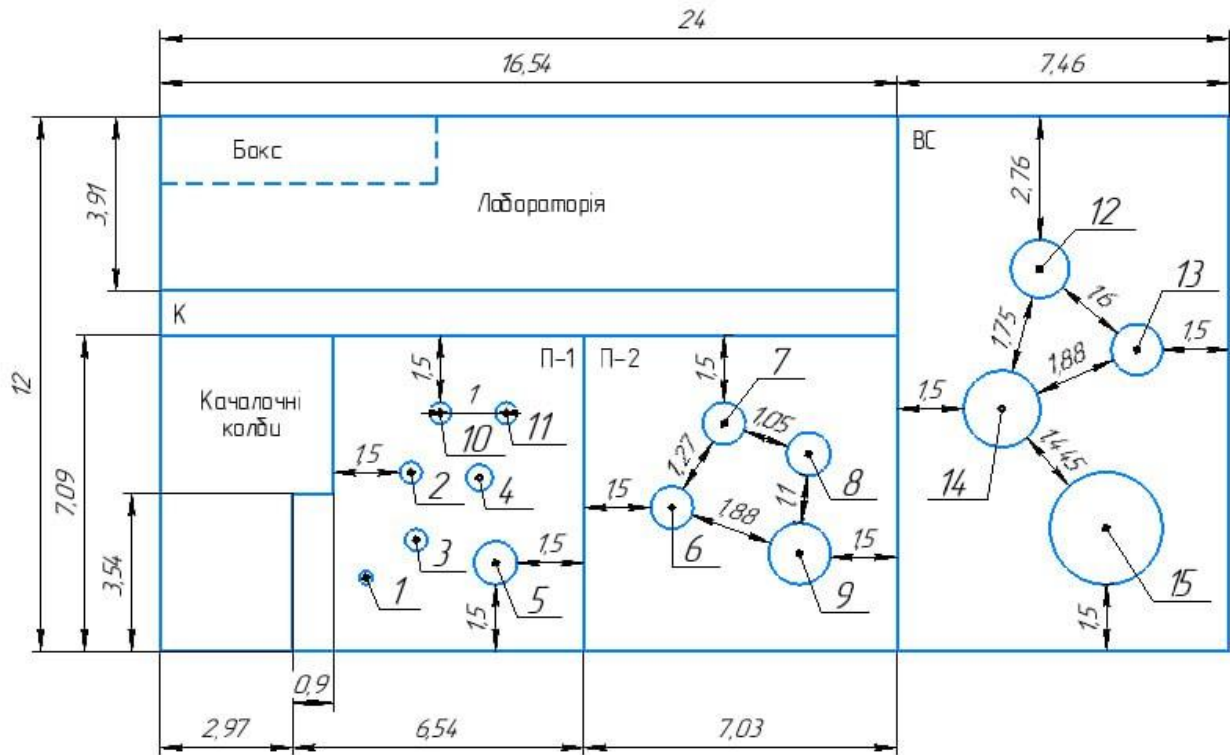


Рис 4.2. Ескіз плану виробничого приміщення для одержанню біомаси *Pseudomonas aureofaciens*

1 – інокулятор об’ємом 6 л; 2,6 – реактор-змішувач для приготування композиції А об’ємом 10 л та 100 л відповідно; 3,7 – реактор для приготування композиції Б об’ємом 10 л та 63 л відповідно; 4 – реактор для приготування композиції В об’ємом 20 л; 5 – посівний апарат об’ємом 63 л; 8 – реактор-змішувач для приготування композиції В об’ємом 160 л; 9 – посівний апарат об’ємом 630л; 12 – реактор-змішувач для приготування композиції А об’ємом 1000 л; 13 – реактор-змішувач для приготування композиції Б об’ємом 630 л ;13 – реактор-змішувач для приготування композиції В об’ємом 1600 л; 14 – ферментер об’ємом 5 м³.

**Габаритні розміри основного обладнання по одержанню біомаси
*Pseudomonas aureofaciens***

Обладнання	Геометричний об'єм,	Діаметр,	Висота,
	л	м	м
Інокулятор	6	0,3	0,3
Реактор-змішувач для приготування композиції А	10	0,485	0,37
Реактор-змішувач для приготування композиції Б	10	0,485	0,37
Реактор-змішувач для приготування композиції В	25	0,585	0,5
Посівний апарат	63	0,965	2,6
Реактор-змішувач для приготування композиції А	100	0,95	1,6
Реактор-змішувач для приготування композиції Б	63	0,95	1,4
Реактор-змішувач для приготування композиції В	160	0,975	1,7
Посівний апарат	630	1,38	2,8
Реактор-змішувач для приготування 6%-го розчину NaOH	10	0,485	0,37
Реактор-змішувач для приготування 6%-го розчину HCl	10	0,485	0,37
Реактор-змішувач для приготування композиції А	1000	1,3	2,18
Реактор-змішувач для приготування композиції Б	630	1,14	1,84
Реактор-змішувач для приготування композиції В	1600	1,71	2,48
Ферментер	5000	2,52	5,6
Всього	9 317		

За даними наведеними в *табл 2.1*, загальний об'єм реакторів-змішувачів та апаратів для вирощування посівного матеріалу і виробничого біосинтезу становить 9 317 м³.

Для забезпечення чистоти виробничих приміщень проводять щоденне та генеральне прибирання. Миття підлоги здійснюють щодня, тобто 50 рази. Один раз на місяць здійснюється обробка стін, підлоги, вікон тощо (генеральне прибирання), тобто 2 рази на 50 дні. Для розрахунку кількості мийних засобів необхідно розрахувати приблизну площу оброблення мийними та дезінфікуючими засобами, враховуючи площу підлоги виробничого приміщення та площу стін на висоту 9 м.

Площа підлоги цеху виробничого біосинтезу становить $7,46 \text{ м} \times 12 \text{ м} = 89,52 \text{ м}^2$, а стін $(7,46 \text{ м} \times 6 \text{ м} + 12 \text{ м} \times 6 \text{ м}) \times 2 = 233,52 \text{ м}^2$. Площа підлоги цехів отримання посівного матеріалу становить $7,03 \text{ м} \times 7,09 \text{ м} + (6,54 \text{ м} - 0,9 \text{ м}) \times 7,09 \text{ м} + 0,9 \text{ м} \times 3,54 \text{ м} = 93,0163 \text{ м}^2$, а стін $(7,03 \text{ м} \times 4,5 \text{ м} + (6,54 \text{ м} - 0,9 \text{ м}) \times 4,5 \text{ м} + 0,9 \text{ м} \times 4,5 \text{ м}) \times 2 +$

$7,09 \text{ м} \times 4,5 \text{ м} \times 4 = 249,75 \text{ м}^2$. Площа підлоги мікробіологічної лабораторії становить $3,91 \text{ м} \times 16,54 \text{ м} = 64,6714 \text{ м}^2$, а стін $(3,91 \text{ м} \times 4,5 \text{ м} + 16,54 \text{ м} \times 4,5 \text{ м}) \times 2 = 184,05 \text{ м}^2$, площа підлоги приміщення з качалочними колбами становить $2,97 \text{ м} \times 7,09 \text{ м} + 0,9 \text{ м} \times (7,09 \text{ м} - 3,54 \text{ м}) = 24,2523 \text{ м}^2$, а стін $((2,97 \text{ м} + 0,9 \text{ м}) \times 4,5 \text{ м} + 7,09 \text{ м} + 4,5 \text{ м}) \times 2 = 98,64 \text{ м}^2$.

Загальну площу поверхні обробки мийними засобами наведено у *табл. 2.2*.

Таблиця 4.2

Розрахунок загальної площі стін та підлоги виробничих приміщень

Приміщення	Площа підлоги, м ²	Площа стін, м ²	Загальна площа, м ²
Цех виробничого біосинтезу та вирощування інокуляту	182,5363	483,27	665,8063
Мікробіологічна лабораторія	64,6714	184,05	248,7214
Приміщення з качалками	24,2523	98,64	122,8923
Загальна площа	271,46	765,96	1037,42

Кількість виробничих циклів по одержанню біомаси *Pseudomonas aureofaciens* становить 45. Оскільки миття обладнання відбувається перед кожним циклом, кількість процесів миття за весь період виробництва складає 46 (додаткове миття після останнього циклу). Тоді загальний об'єм миття становитиме:

$$12,687 \cdot 46 = 583,602 \text{ м}^3$$

Узагальнені дані щодо розрахунку площі миття та дезінфекції за весь період виробництва наведено в *табл. 2.3*.

Таблиця 4.3

Розрахунок загальної площі миття та дезінфекції оброблювального об'єкту за весь період виробництва біомаси *Pseudomonas aureofaciens*

Об'єкт миття та дезінфекції	Площа (об'єм) оброблюваного об'єкту, м ² (м ³)	Кількість процесів миття та дезінфекції за весь період виробництва	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)
Обладнання	9,317	46	428,582
Підлога	271,46	50	13 573
Стіни, двері, вікна	765,96	2	1 531,92

Дані щодо вибору мийних та дезінфікуючих засобів наведені у *табл. 4.4*.

Отже, найкращим мийно–дезінфікуючим засобом для стін, підлоги, вікон, дверей – «Дезактін», а для обладнання – «Біомой». Засоби рекомендовано чергувати кожні 1–3 місяці для запобігання розвитку та розповсюдження резистентних форм мікроорганізмів, тому у *табл. 2.4* наведено кілька мийючих і кілька дезінфікуючих засобів. Вони мають різні спектри антимікробної дії, корозійну активність, дію на організм людини, стабільність.

Таблиця 4.4

Узагальнена характеристика витрат мийних та дезінфікуючих засобів для одержання біомаси

Pseudomonas aureofaciens

Назва мийного/дезінфікуючого засобу (діюча речовина)	Об'єкт миття та дезінфекції	Концентрація робочого розчину	Загальна площа (об'єм) миття та дезінфекції об'єкту за весь період виробництва, м ² (м ³)	Кількість робочого розчину за весь період виробництва, л	Вартість 1 л/кг мийного/дезінфікуючого засобу, грн	Вартість 1 л робочого розчину, грн	Загальна вартість миття та дезінфекції за весь період виробництва, грн
«Дезактін» ²¹ (дихлорантин)	Стіни, підлога, вікна, двері	0,2%	15 104,92	1 510,5	430	0,9	1 359,5
«Велідез» ²¹ (ЧАС*, 2-пропанол, комплекс ензимів)	Стіни, підлога, вікна, двері	3%	15 104,92	1 510,5	495	14,9	22 506,5
Biolong "Універсальний" ²³ (ЧАС*, ПАР*)	Стіни, підлога, вікна, двері	4%	15 104,92	1 510,5	76	3	4 531,5
«Чистолайн-Універсал» ²⁴ (ПАР*)	Обладнання	1%	428,582	85 717	272	2,7	231 436
Дезосепт Форте ²⁵ (надоцтова кислота, перекись водню, оцтова кислота)	Обладнання	1%	428,582	85 717	116	1,2	102 860
Біомой ²⁶ (сульфанол)	Обладнання	0,3%	428,582	85 717	269	0,8	51 430

Примітка: *ЧАС – четвертинні амонієві сполуки, ПАР – поверхнево-активні речовини.

4.1.4. Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища

Виробничий біосинтез здійснюється у ферментері об'ємом 5 м³, що містить 3 м³ поживного середовища. Інокулянт отримують у чотири стадії: у колбах на качалці, у посівних апаратах об'ємом 6 л, 0,063 м³ та 0,63 м³.

Для культивування *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 використовується середовище такого складу (г/л):

- нафталін – 1
 - глюкоза – 2
 - трис – 6,06
 - NaCl – 4,68
 - KCl – 1,49
 - NH₄Cl – 1,07
 - Na₂SO₄ – 0,43
 - MgCl₂×6H₂O – 0,2
 - CaCl₂×6H₂O – 0,03
 - Na₂HPO₄×12H₂O – 0,23
 - FeNH₄ цитрат – 0,005
- pH середовища 7 [2].

Усі компоненти даного поживного середовища підлягають стерилізації, окрім нафталіну, оскільки він є канцерогенним та не потребує стерилізації.

Також необхідно визначити вміст мікроелементів, необхідний для кожної стадії технологічного процесу (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

Розрахунок вмісту мікроелементів у різних об'ємах поживного середовища

Об'єм середовища, л	Вміст мікроелементів	
	FeNH ₄ цитрат	CaCl ₂ ×6H ₂ O
0,3	1,5 мг	9 мг
3	15 мг	90 мг
30	150 мг	0,9 г
290	1,45 г	8,7 г
3000	15 г	90 г

З розрахунків наведених в табл. 2.1 можна зробити висновок, що FeNH_4 цитрат та $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ виступають мікроелементами лише при культивуванні в колбах на качалках. На наступних стадіях мікроелементи можна вносити в композицію з іншими солями.

Для того, щоб визначити спосіб приготування титрувальних агентів (6 %-го розчину соляної кислоти, 6 %-го розчину натрію гідроксиду) потрібно розрахувати кількість цих компонентів, необхідну для приготування поживного середовища на кожну зі стадій виробництва (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Розрахунок вмісту та особливості приготування деяких компонентів поживного середовища

Об'єм середовища, л	HCl (6%)		NaOH (6%)	
	Об'єм, мл	Особливість приготування	Об'єм, мл	Особливість приготування
0,3	-	-	-	-
3	-	-	-	-
30	120	у колбі на 150 мл	120	у колбі на 250 мл
290	1160	у колбі на 2 л	1160	у колбі на 2 л
3000	6000	у реакторі на 10 л	6000	у реакторі на 10 л

Нижче наведено особливості приготування і стерилізації середовища для вирощування інокуляту (4 стадії) і виробничого біосинтезу.

Особливості підготовки та стерилізації поживного середовища для одержання інокуляту в колбах на качалках.

Стерилізацію середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалках будемо здійснювати в автоклаві, оскільки його об'єм невеликий (0,3 л). Проаналізувавши склад поживного середовища для вирощування *P. aureofaciens* ВКМ В-2501, умовно ділимо його на такі композиції (залежно від режиму стерилізації компонентів):

Композиція А: трис, NaCl, KCl, NH₄Cl, Na₂SO₄, MgCl₂×6H₂O, (режим стерилізації 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція Б: Na₂HPO₄×12H₂O (режим стерилізації 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Композиція Г: нафталін (стерилізації не потребує).

Компоненти композиції А стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфат (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинного фосфату магнію. Композиція В є термолабільною і потребує м'якого режиму стерилізації. Композицію Г розчиняють у воді для утворення суспензії та вноситься у поживне середовище безпосередньо перед культивуванням. Стерилізацію композицій А, Б та В здійснюють в автоклаві.

Окремо готують запасні розчини CaCl₂×6H₂O та FeNH₄ цитрат, які також стерилізують в автоклаві при 131 °С упродовж 40 хв.

Об'єм поживного середовища становить $V_{\text{пс5}} = 0,3$ л.

Розподіл загального об'єму поживного середовища на композиції приймаємо наступний: композиція А% – 40%; Б% – 10%, В% – 20%; Г% – 30%.

Відповідно об'єми композицій приймаються:

Композиція А: $V_{\text{А5}} = V_{\text{пс5}} \cdot \text{А\%} = 300 \cdot 0,4 = 120$ мл

Композиція Б: $V_{\text{Б5}} = V_{\text{пс5}} \cdot \text{Б\%} = 300 \cdot 0,1 = 30$ мл

Композиція В: $V_{\text{В5}} = V_{\text{пс5}} \cdot \text{В\%} = 300 \cdot 0,2 = 60$ мл

Композиція Г: $V_{\text{Г5}} = V_{\text{пс5}} \cdot \text{Г\%} = 300 \cdot 0,3 = 90$ мл

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці наведений у табл. 4.7:

Композиції стерилізації компонентів для вирощування посівного матеріалу в колбах на качалці

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	К-ть для приготування 300 мл середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, мл
Трис	6,06	1,82 г	А	120
NaCl	4,68	1,4 г		
KCl	1,49	0,45 г		
NH ₄ Cl	1,07	0,32 г		
Na ₂ SO ₄	0,43	0,13 г		
MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,2	0,06 г		
Вода	120 мл			
Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	0,23	0,07 г	Б	30
Вода	30 мл			
Глюкоза	2	0,6 г	В	60
Вода	60 мл			
Нафталін	1	0,3 г	Г	90
Вода	90 мл			
Розчин мікроелементів	35 мг	10 мг	–	
Усього				300

У даному випадку при розрахунку води для приготування композицій поживного середовища від об'єму рідини не віднімалися об'єми солей, нафталіну та розчин мікроелементів, тому що вони мізерні. Інакше буде незручно відміряти об'єми води під час роботи (для композиції А – 116,12 мл, для композиції Б – 29,93 мл, для композиції В – 59,4 мл, для композиції В – 89,7 мл). Також не віднімаємо об'єм посівного матеріалу, тому що при внесенні у качалочні колби він складає всього кілька мілілітрів.

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для вирощування інокуляту в посівному апараті.

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 6 л

Для цієї стадії необхідно 3 л поживного середовища, стерилізація якого здійснюватиметься у автоклаві, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: трис, NaCl, KCl, NH₄Cl, Na₂SO₄, MgCl₂×6H₂O, CaCl₂×6H₂O, FeNH₄ цитрат (режим стерилізації 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція Б: Na₂HPO₄×12H₂O (режим стерилізації 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція В: глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Композиція Г: нафталін (стерилізації не потребує).

Компоненти композиції А стерилізують при стандартній для солей температурі. Фосфат (композиція Б) стерилізують окремо, щоб запобігти утворенню нерозчинного фосфату магнію. Композиція В є термолабільною і потребує м'якого режиму стерилізації. Композицію Г розчиняють у воді для утворення суспензії та вноситься у поживне середовище безпосередньо перед культивуванням.

Стерилізацію композицій А, Б і В здійснюють в автоклаві.

Об'єм поживного середовища становить $V_{\text{пс4}} = 3$ л.

У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі загальні витрати компонентів на $V_{\text{пс4}}$ (л) складуть:

$$G_{\text{ін}} = V_{\text{пс4}} \cdot C_{\Sigma\text{пм}} = 3 \cdot 17,195 = 51,585 \text{ г}$$

Розподіл загального об'єму поживного середовища на композиції приймаємо наступний: композиція А% – 40%; Б% – 10%, В% – 20%; Г% – 30%.

Відповідно об'єми композицій приймаються, л:

$$\text{Композиція А: } V_{\text{А4}} = V_{\text{пс4}} \cdot \text{А\%} = 3,0 \cdot 0,4 = 1,2 \text{ л}$$

$$\text{Композиція Б: } V_{\text{Б4}} = V_{\text{пс4}} \cdot \text{Б\%} = 3 \cdot 0,1 = 0,3 \text{ л}$$

$$\text{Композиція В: } V_{\text{В4}} = V_{\text{пс4}} \cdot \text{В\%} = 3 \cdot 0,2 = 0,6 \text{ л}$$

$$\text{Композиція Г: } V_{\text{Г4}} = V_{\text{пс4}} \cdot \text{Г\%} = 3 \cdot 0,3 = 0,9 \text{ л}$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для посівного апарата

Кількість води визначаємо за наступною формулою:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пс4}} - (G_{\text{па}}/1000) = 3 - (51,585/1000) = 2,95 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції А:

$$V_{\text{вА}} = V_{\text{в}} \cdot 0,5 = 2,95 \cdot 0,4 = 1,18 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції Б:

$$V_{\text{вБ}} = V_{\text{в}} \cdot 0,1 = 2,95 \cdot 0,1 = 0,3 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції В:

$$V_{ВВ} = V_{В} \cdot 0,2 = 2,95 \cdot 0,2 = 0,6 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції Г:

$$V_{ВГ} = V_{В} \cdot 0,3 = 2,95 \cdot 0,3 = 0,89 \text{ л}$$

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 6 л наведений у табл. 4.8:

Таблиця 4.8

Композиції стерилізації компонентів для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 6 л

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	К-ть для приготування 3 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Трис	6,06	18,18 г	А	1,2
NaCl	4,68	14,04 г		
KCl	1,49	4,47 г		
NH ₄ Cl	1,07	3,21 г		
Na ₂ SO ₄	0,43	1,29 г		
MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,2	0,6 г		
CaCl ₂ ×6H ₂ O	0,03	0,09 г		
FeNH ₄ цитрат	0,005	0,015 г		
Вода	1,18 л			
Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	0,23	0,69 г	Б	0,3
Вода	0,3 л			
Глюкоза	2	6 г	В	0,6
Вода	0,6 л			
Нафгалін	1	3 г	Г	0,9
Вода	0,89 л			
Усього				3 л

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом 0,063 м³

Для цієї стадії необхідно 30 л поживного середовища, стерилізація якого здійснюватиметься у відповідному посівному апараті, що потребує перескладання композицій поживного середовища:

Композиція А: трис, NaCl, KCl, NH₄Cl, Na₂SO₄, MgCl₂×6H₂O, CaCl₂×6H₂O, FeNH₄ цитрат, Na₂HPO₄×12H₂O (режим стерилізації 131°C, 40 хв, 0,15 МПа).

Композиція Б: глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Композиція В: нафталін (стерилізації не потребує).

Стерилізація композиції А відбувається в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції Б. Солі розчиняють в окремому реакторі, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація. Композицію А стерилізують в посівному апараті (для зменшення ймовірності контамінації), але за попереднього підкислення до рН 4,0-4,5 хлоридною кислотою, щоб не утворився осад фосфатів. Після стерилізації необхідно буде довести рН до 7,0 стерильним розчином натрію гідроксиду. Композицію В розчиняють в окремому реакторі з додаванням води для утворення суспензії та подають у поживне середовище безпосередньо перед культивуванням.

Об'єм поживного середовища становить $V_{\text{псз}} = 30$ л.

У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі загальні витрати компонентів на $V_{\text{псз}}$ (л) складуть:

$$G_{\text{ін}} = V_{\text{псз}} \cdot C_{\text{сум}} = 30 \cdot 17,195 = 515,85 \text{ г}$$

Розподіл загального об'єму поживного середовища на композиції приймаємо наступний: композиція А% – 30%; Б% – 20%; В% – 50%.

Відповідно об'єми композицій приймаються, л:

$$\text{Композиція А: } V_{\text{Аз}} = V_{\text{псз}} \cdot \text{А\%} = 30 \cdot 0,3 = 9 \text{ л}$$

$$\text{Композиція Б: } V_{\text{Бз}} = V_{\text{псз}} \cdot \text{Б\%} = 30 \cdot 0,2 = 6 \text{ л}$$

$$\text{Композиція В: } V_{\text{Вз}} = V_{\text{псз}} \cdot \text{В\%} = 30 \cdot 0,5 = 15 \text{ л}$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для посівного апарата

Кількість води визначаємо за наступною формулою:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{псз}} - (G_{\text{па}}/1000) = 30 - (515,85 / 1000) = 29,5 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції А:

$$V_{\text{вА}} = V_{\text{в}} \cdot 0,4 = 29,5 \cdot 0,3 = 8,85 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції Б:

$$V_{\text{вБ}} = V_{\text{в}} \cdot 0,6 = 29,5 \cdot 0,2 = 5,9 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції В:

$$V_{\text{вВ}} = V_{\text{в}} \cdot 0,6 = 29,5 \cdot 0,5 = 14,75 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції А, із врахуванням $K_{\text{кон}}=10\%$ конденсату:

$$V_{\text{кА}} = 8,85 \cdot 0,1 = 0,885 \text{ л}$$

$$V_{\text{врА}} = 8,85 - 0,885 = 7,97 \text{ л}$$

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом $0,063 \text{ м}^3$ наведений у табл. 4.9:

Таблиця 4.9

Композиції стерилізації компонентів для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом $0,063 \text{ м}^3$

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	К-ть для приготування 30 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Трис	6,06	181,8 г	А	9
NaCl	4,68	140,4 г		
KCl	1,49	44,7 г		
NH ₄ Cl	1,07	32,1 г		
Na ₂ SO ₄	0,43	12,9 г		
MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,2	6 г		
CaCl ₂ ×6H ₂ O	0,03	0,9 г		
FeNH ₄ цитрат	0,005	0,15 г		
Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	0,23	6,9 г		
Вода		7,97 л		
Конденсат		0,885 л		
Глюкоза	2	60 г	Б	6
Вода		5,9 г		
Нафталін	1	30 г	В	15
Вода		14,75 л		
Усього				30

Вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом $0,63 \text{ м}^3$

Для цієї стадії необхідно 290 л поживного середовища, стерилізація якого здійснюватиметься у відповідному посівному апараті. Перескладання композицій поживного середовища не потребує:

Композиція А: трис, NaCl, KCl, NH₄Cl, Na₂SO₄, MgCl₂×6H₂O, CaCl₂×6H₂O, FeNH₄ цитрат, Na₂HPO₄×12H₂O (режим стерилізації 131°C , 40 хв, $0,15 \text{ МПа}$).

Композиція Б: глюкоза (режим стерилізації: 112°C , 30 хв, $0,05 \text{ МПа}$).

Композиція В: нафталін (стерилізації не потребує).

Стерилізація композиції А відбувається в посівному апараті, тому що умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції Б. Солі розчиняють в окремому реакторі, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація. Композицію А стерилізують в посівному апараті (для зменшення ймовірності контамінації), але за попереднього підкислення до рН 4,0-4,5 хлоридною кислотою, щоб не утворився осад фосфатів. Після стерилізації необхідно буде довести рН до 7,0 стерильним розчином натрію гідроксиду. Композицію В розчиняють в окремому реакторі з додаванням води для утворення суспензії та подають у поживне середовище безпосередньо перед культивуванням.

Об'єм поживного середовища становить $V_{\text{пс2}} = 290$ л.

У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі загальні витрати компонентів на $V_{\text{пс2}}$ (л) складуть:

$$G_{\text{ін}} = V_{\text{пс2}} \cdot C_{\Sigma\text{пм}} = 290 \cdot 17,195 = 4\,986,55 \text{ г}$$

Розподіл загального об'єму поживного середовища на композиції приймаємо наступний: композиція А% – 30%; Б% – 20%; В% – 50%.

Відповідно об'єми композицій приймаються, л:

$$\text{Композиція А: } V_{\text{А2}} = V_{\text{пс2}} \cdot \text{А\%} = 290 \cdot 0,3 = 87 \text{ л}$$

$$\text{Композиція Б: } V_{\text{Б2}} = V_{\text{пс2}} \cdot \text{Б\%} = 290 \cdot 0,2 = 58 \text{ л}$$

$$\text{Композиція В: } V_{\text{В2}} = V_{\text{пс2}} \cdot \text{В\%} = 290 \cdot 0,5 = 145 \text{ л}$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для посівного апарата

Кількість води визначаємо за наступною формулою:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пс2}} - (G_{\text{па}}/1000) = 290 - (4986,55 / 1000) = 285 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції А:

$$V_{\text{вА}} = V_{\text{в}} \cdot 0,4 = 285 \cdot 0,3 = 85,5 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції Б:

$$V_{\text{вБ}} = V_{\text{в}} \cdot 0,6 = 285 \cdot 0,2 = 57 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції В:

$$V_{\text{вВ}} = V_{\text{в}} \cdot 0,6 = 285 \cdot 0,5 = 142,5 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції А, із врахуванням $K_{\text{кон}}=10\%$ конденсату:

$$V_{\text{кА}} = 85,5 \cdot 0,1 = 8,55 \text{ л}$$

$$V_{\text{врА}} = 85,5 - 8,55 = 76,95 \text{ л}$$

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом $0,63 \text{ м}^3$ наведений у табл. 4.10:

Таблиця 4.10

Композиції стерилізації компонентів для вирощування інокуляту в посівному апараті об'ємом $0,63 \text{ м}^3$

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	К-ть для приготування 290 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Трис	6,06	1 757,4 г	А	87
NaCl	4,68	1 357,2 г		
KCl	1,49	432,1 г		
NH ₄ Cl	1,07	310,3 г		
Na ₂ SO ₄	0,43	124,7 г		
MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,2	58 г		
CaCl ₂ ×6H ₂ O	0,03	8,7 г		
FeNH ₄ цитрат	0,005	1,45 г		
Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	0,23	66,7 г		
Вода		76,95 л		
Конденсат		8,55 л	Б	58
Глюкоза	2	580 г		
Вода		57 л	В	145
Нафгалін	1	290 г		
Вода		142,5 л		
Усього				290

Особливості підготовки і стерилізації поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 5 м^3 .

Для цієї стадії необхідно 3000 л поживного середовища, стерилізація якого здійснюватиметься у збірниках. Перескладання композицій поживного середовища не потребує:

Композиція А: трис, NaCl, KCl, NH₄Cl, Na₂SO₄, MgCl₂×6H₂O, CaCl₂×6H₂O, FeNH₄ цитрат, Na₂HPO₄×12H₂O (режим стерилізації 131°C , 40 хв, $0,15 \text{ МПа}$).

Композиція Б: глюкоза (режим стерилізації: 112 °С, 30 хв, 0,05 МПа).

Композиція Б: нафталін (стерилізації не потребує).

Стерилізація композиції А відбувається в збірнику, тому що умови її стерилізації є жорсткішими, ніж композиції Б. Солі розчиняють в окремому реакторі, з якого потім вони будуть подані в посівний апарат, де проводиться стерилізація. Композицію А стерилізують в посівному апараті (для зменшення ймовірності контамінації), але за попереднього підкислення до рН 4,0-4,5 хлоридною кислотою, щоб не утворився осад фосфатів. Після стерилізації необхідно буде довести рН до 7,0 стерильним розчином натрію гідроксиду. Композицію В розчиняють в окремому реакторі з додаванням води для утворення суспензії та подають у поживне середовище безпосередньо перед культивуванням.

Об'єм поживного середовища становить $V_{\text{пс1}} = 3000$ л.

У відповідності з прийнятим складом поживного середовища для вирощування посівного матеріалу в інокуляторі загальні витрати компонентів на $V_{\text{пс1}}$ (л) складуть:

$$G_{\text{ін}} = V_{\text{пс1}} \cdot C_{\Sigma\text{пм}} = 3000 \cdot 15,195 = 51\,585 \text{ г}$$

Розподіл загального об'єму поживного середовища на композиції приймаємо наступний: композиція А% – 40%; Б% – 60%.

Відповідно об'єми композицій приймаються, л:

$$\text{Композиція А: } V_{\text{А2}} = V_{\text{пс2}} \cdot \text{А\%} = 3000 \cdot 0,3 = 900 \text{ л}$$

$$\text{Композиція Б: } V_{\text{Б2}} = V_{\text{пс2}} \cdot \text{Б\%} = 3000 \cdot 0,2 = 600 \text{ л}$$

$$\text{Композиція В: } V_{\text{В2}} = V_{\text{пс2}} \cdot \text{В\%} = 3000 \cdot 0,5 = 1500 \text{ л}$$

Розрахунок кількості води для приготування поживного середовища для посівного апарата

Кількість води визначаємо за наступною формулою:

$$V_{\text{в}} = V_{\text{пс1}} - (G_{\text{па}}/1000) = 3000 - (51585 / 1000) = 2949 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції А:

$$V_{\text{вА}} = V_{\text{в}} \cdot 0,4 = 2949 \cdot 0,3 = 885 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції Б:

$$V_{\text{вБ}} = V_{\text{в}} \cdot 0,6 = 2949 \cdot 0,2 = 590 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції В:

$$V_{\text{ВВ}} = V_{\text{В}} \cdot 0,4 = 2949 \cdot 0,5 = 1474 \text{ л}$$

Витрати води на приготування композиції А, із врахуванням $K_{\text{кон}}=10\%$ конденсату:

$$\text{Об'єм конденсату } V_{\text{кА}} = 885 \cdot 0,1 = 88,5 \text{ л}$$

$$V_{\text{врА}} = 885 - 88,5 = 796,5 \text{ л}$$

Розрахунок необхідних кількостей компонентів для приготування середовища для вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом $0,63 \text{ м}^3$ наведений у табл. 4.11:

Таблиця 4.11

Компонент поживного середовища	Вміст, г/л	К-ть для приготування 3000 л середовища	Композиція	Об'єм композиції, V, л
Трис	6,06	18,18 кг	А	927
NaCl	4,68	14,04 кг		
KCl	1,49	4,47 кг		
NH ₄ Cl	1,07	3,21 кг		
Na ₂ SO ₄	0,43	1,29 кг		
MgCl ₂ ×6H ₂ O	0,2	600 г		
CaCl ₂ ×6H ₂ O	0,03	90 г		
FeNH ₄ цитрат	0,005	15 г		
Na ₂ HPO ₄ ×12H ₂ O	0,23	690 г		
Вода		796,5		
Конденсат		88,5		
Глюкоза	2	6 кг	Б	596
Вода		590		
Нафталін	1	3 кг	В	1477
Вода		1474 л		
Усього				3000

4.2. Основні етапи післяферментаційного виділення, концентрування та очищення цільового продукту.

В культуральній рідині після закінчення процесу ферментації містяться мікроорганізми, продукти їх життєдіяльності, залишки поживного середовища, піногасник, розчинні і нерозчинні речовини. Цільовим продуктом біосинтезу можуть бути безпосередньо самі мікроорганізми або їх метаболіти, що розчинені в культуральній рідині або знаходяться всередині клітин мікроорганізмів [27].

Оскільки в культуральній рідині містяться біологічно активні метаболіти, які необхідні для активності препарату, то цільовим продуктом буде виступати

культуральна рідина.

Після аналізу літературних джерел можна сформувати наступну схему післяферментаційних етапів:

- стабілізацію (консервування);
- фасування продукту (розлив) [28].

4.2.1. Вибір способу стабілізації культуральної рідини

Необхідність стабілізації матеріалів біологічного походження, що пов'язана з їх надзвичайною нестійкістю, виникла на зорі біологічної науки. Відомо, що в звичайних умовах тривалість збереження більшості біологічних продуктів обмежується кількома днями. У зв'язку з цим розроблялися різні способи консервування біологічних препаратів можна розділити на:

- консервування при позитивних температурах за допомогою хімічних сполук (хлороформ, фенол, гліцерин, формалін і т.д.);
- консервування при низьких температурах (заморожування);
- консервування висушуванням [29].

Висушування є одним з найбільш досконалих процесів стабілізації властивостей продуктів біологічного (рослинного, тваринного, мікробіологічного) походження і дозволяє зберігати дані продукти в звичайних умовах тривалий час. Крім того, істотно зменшена маса дозволяє значно знизити транспортні витрати і витрати на тару.

Необхідно відзначити, що зневоднення – важкий технологічний процес, який часто є вирішальним етапом виробництва, що впливає на якість продукції, що випускається.

Перевагою штучного висушування є значно менші витрати часу на видалення вологи. Процес сушіння – це різноманітний комплекс теплових, дифузійних, часто біологічних і хімічних явищ (особливо коли справа стосується інтенсивної сушки). Препарати біологічного походження зазвичай представляють собою складні об'єкти сушки, які характеризуються рядом показників, найважливішими з яких є початкова, кінцева і рівноважна вологість, термічні, електрофізичні, структурно-механічні та масообмінні характеристики. Різноманітність властивостей продуктів вимагає

індивідуального підходу до розробки раціональних методів їх сушки (з урахуванням вимог до якості готового виробу) [30].

Консервування при низьких температурах, таке як заморожування, ще один із метод зберігання біологічних матеріалів.

Заморожування дозволяє зберігати культуральну рідину при низьких температурах, що дозволяє знизити рівень активності біологічних процесів і зменшити можливість розвитку мікроорганізмів. Також заморожування може забезпечити довгострокове зберігання біологічного матеріалу без втрати його властивостей [31].

Однак, при заморожуванні може виникнути певний ризик псування культури через утворення кристалів льоду, які можуть пошкодити клітини і знизити їх життєздатність. Тому необхідно дотримуватися правильної процедури заморожування, включаючи додавання захисних речовин, таких як кріопротектори, до культуральної рідини перед заморожуванням. Кріопротектори забезпечують захист клітин від утворення кристалів льоду і допомагають зберегти їх життєздатність під час розморожування [32].

Метод консервування при позитивних температурах за допомогою хімічних сполук полягає в додаванні хімічних речовин до біологічного матеріалу з метою зупинити його розвиток і зберігання при певних умовах.

Цей метод зазвичай використовується для консервації бактерій, грибів, вірусів, та інших біологічних матеріалів. Різні хімічні сполуки можуть використовуватися як консерванти, включаючи гліцерин, хлороформ, фенол, формалін та інші. Під час застосування цього методу особливу увагу потрібно звертати на вибір оптимальної концентрації консерванта та температуру зберігання, щоб забезпечити максимальну ефективність консервування та збереження біологічного матеріалу [29].

Метод консервування при позитивних температурах за допомогою хімічних сполук, таких як хлороформ, фенол, гліцерин, формалін і т.д., має свої переваги над іншими методами:

- Цей метод забезпечує високий рівень збереження культури, дозволяючи зберегти їх при кімнатній температурі.

- Завдяки використанню хімічних речовин можна досягти стабільності клітин та забезпечення їх від забруднення іншими мікроорганізмами.
- Цей метод дозволяє більше зберегти культуру, незважаючи на методи, що використовують холодильне чи заморожувальне обладнання [33].

Характеристика хімічних сполук, які можуть виступати консервантами:

- Хлороформ використовується як консервант, оскільки він здатен знищувати мікроорганізми та інактивувати ферменти. Однак його використання повинно бути обмеженим, оскільки він є токсичним для людей та небезпечним для навколишнього середовища.
- Фенол також може використовуватися як консервант для біопрепаратів. Він здатен знищувати мікроорганізми та захищати препарат від забруднення. Однак він також може бути токсичним для людей та небезпечним для навколишнього середовища.
- Гліцерин може використовуватися як консервант для біопрепаратів, оскільки він здатний зберігати вологу та захищати біологічний матеріал від деградації. Він також не є токсичним для людей та менш небезпечним для навколишнього середовища, ніж хлороформ чи фенол.
- Формалін може використовуватися як консервант для біопрепаратів, оскільки він здатен знищувати мікроорганізми та захищати біологічний матеріал від деградації. Однак він також може бути токсичним для людей та небезпечним для навколишнього середовища [34].

Проаналізувавши хімічні сполуки, які можуть виступати консервантами зупинимось на гліцерині, оскільки він є менш токсичним в порівнянні з іншими, що є дуже важливим для біопрепарату, оскільки в середовищі вже міститься нафталін, який буде виступати консервантом та є токсичним. Також гліцерин може більш підходящий для зберігання бактеріальних культур при позитивних температурах, оскільки він забезпечує захист бактерій від висихання та дезінфекційних засобів, що робить більш зручним зберігання продукту.

Для методу консервування біопрепарату на основі культуральної рідини *Pseudomonas aureofaciens* за допомогою гліцерину можна використовувати автоматизовані системи змішування, наповнення та закриття упаковки.

4.2.2. Вибір способу фасування та упаковки для культуральної рідини

Процес фасування готової продукції повинен забезпечити збереження стерильності, стабільності, надійності, зручності при транспортуванні.

Розлив культуральної рідини на виробництві зазвичай виконується за допомогою автоматизованого обладнання, яке забезпечує точний та швидкий процес розливу. Таке обладнання може включати в себе насоси, що забезпечують подачу рідини до наповнювального блоку, блоки дозування, які визначають кількість рідини, що буде розлита в кожен пляшку, а також блоки капсулювання, які закривають пляшки з рідинами.

Важливо забезпечити стерильність усіх етапів процесу розливу. Для цього можна використовувати спеціальне обладнання, що забезпечує автоматичне очищення та дезінфекцію всіх елементів, які контактують з рідиною.

Для розливу культуральної рідини на великому виробництві також можуть використовуватися спеціальні пакувальні лінії, що забезпечують автоматичне розливання рідини та упакування її в пляшки або іншу тару. Ці лінії можуть бути налаштовані для роботи з різними розмірами пляшок та іншої тари [35].

Для розливу культуральної рідини можна використовувати пластикові пляшки та/або каністри.

Розлив культуральної рідини по пластиковим пляшкам є досить поширеним способом фасування біопрепаратів, включаючи культуральні рідини. Цей спосіб має декілька переваг:

1. Легкість та маневреність. Пластикові пляшки легко переносити, зберігати і транспортувати.
2. Прозорість. Пластикові пляшки зазвичай виготовляються з прозорого матеріалу, що дозволяє візуально контролювати стан культуральної рідини.
3. Витривалість. Пластикові пляшки міцні та довговічні, тому що вони виготовляються з високоякісних матеріалів.

4. Ізольованість від зовнішнього середовища. Пластикові пляшки добре захищають вміст від зовнішнього середовища, у тому числі від світла та кисню.
5. Наявність різних розмірів та форм. Пластикові пляшки доступні у різних розмірах та формах, що дозволяє підібрати пляшку для будь-яких потреб.
6. Екологічність. Пластикові пляшки можуть бути відновлені та використовуватися повторно, що робить їх екологічно чистим варіантом фасування.
7. Вартість. Виробництво пластикових пляшок зазвичай дешевше порівняно з іншими матеріалами, такими як скло або метал.
8. Безпечність. Пластикові пляшки безпечні у використанні та транспортуванні, так як вони не розбиваються, не стикаються та не руйнуються під час перевезення.

Деякі з недоліків використання пластмасових пляшок можуть включати:

1. Низька стійкість до високих температур. Деякі пластикові пляшки можуть розтопитися або пошкодитися при високих температурах.
2. Можлива взаємодія з продуктом. Пластикові пляшки можуть взаємодіяти зі продуктом, що може призвести до зміни властивостей продукту.
3. Екологічна проблема відходів [36].

До переваг використання каністр як пакувальної тари для зберігання рідинних біопрепаратів належать:

1. Міцність та стійкість до зношування. Каністри зазвичай виготовляють з міцних матеріалів, таких як поліетилен або поліпропілен, що забезпечує їх довговічність та стійкість до зношування.
2. Зручність в застосуванні. Каністри зазвичай мають широку горловину та простий механізм закривання, що дозволяє легко налити або відлити рідину.
3. Більший об'єм. Каністри можуть мати більший об'єм порівняно з пластиковими пляшками, що дозволяє економити час та зусилля на розливі.

Недоліки використання каністр як пакувальної тари для рідинних біопрепаратів можуть включати:

1. Важкість. Каністри зазвичай важчі за пластикові пляшки, що може бути проблемою для транспортування та зберігання.
2. Незручність в застосуванні. На відміну від пластикових пляшок, каністри можуть бути незручними у використанні на деяких етапах виробництва, таких як дозування та розлив.
3. Вартість. Каністри зазвичай коштують більше за пластикові пляшки [37].

Проаналізувавши всі переваги та недоліки використання каністр та пластикових пляшок для проєктованого виробництва обираємо пластикові пляшки, через їх практичність, зручність, екологічність та вартість.

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.

Специфікація обладнання, зображеного на апаратурній схемі, наведена в табл.

5.1.

Таблиця 5.1.

Специфікація ділянки доферментаційних процесів виробництва біомаси

Pseudomonas aureofaciens

Позиція	Найменування	К-ть	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрязабірник	1	Забірник повітря, висотою 8 м над дахом, оснащений металевою сіткою від механічних забруднень
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Панельний фільтр грубої очистки повітря Macrogen GT Duo. Призначений для попередньої очистки повітря. Продуктивність від 0 до 5000 м ³ /год. Матеріал: поліуретан. Може витримувати тиск до 2 МПа. Торгова марка (ТМ) «MANN+HUMMEL». Країна: Германія ¹
К-3	Компресор	1	Компресор CWD15A II-PM. Потужність двигуна: 15 кВт. Максимальна продуктивність – 3 м ³ /хв. Рівень шуму: 68 дБ. Розміри (д×ш×в, мм): 1480×850×1180. Вага 780 кг. ТМ: «Crownwell». Країна: Китай ²
Т-4 Т-6	Теплообмінник-охолоджувач Теплообмінник-нагрівач	2	Теплообмінник PARAWELD. Складається з пари спаяних пластин, які використовуються в лазерно-спаяному процесі. Можливий варіант матеріалу пластини: AISI 316, AISI 904L, 254 SMO, Hastelloy, C2000, титан і нікель. Робоча температура -45°С до +250°С. -45°С до +250°С. ТМ: «ТАПФЛО». Країна: Україна ³
Р-5	Ресивер	1	Ресивер РМК-5-10. Робочий тиск – 10 атм. Розміри (в×д, мм): 3940×1400. Товщина стінки – 8 мм. Робочий об'єм – 5 м ³ . ТМ: «Монтажник-К». Країна: Україна ⁴
Ф-7	Головний фільтр очистки повітря	1	Фільтр тонкої очистки стисненого повітря ОМІ НФ 0030 ¾. Продуктивність до 3000 л/хв. Максимальний тиск до 16 бар. Ступінь очистки до 0,01 мкм. Розміри (в×ш, мм): 280×90. Кількість карманів – 6. Пропускна спроможність 3 м ³ /год. ТМ: «ОМІ». Країна: Італія ⁵
Ф-8 Ф-17 Ф-26 Ф-34	Індивідуальний фільтр	4	НЕРА фільтр. Застосовується для фільтрації аерозолів, наприклад, частинок забруднень повітря до 0,1 мкм, для уловлювання завислих речовин – вірусів, мікроорганізмів, токсичного пилу. Клас чистоти Н14 (ефективність 99,995%). Розміри (в×ш, мм): 762×1220. Матеріал фільтратора: мікроскловолокно. ТМ: «Selton». Країна: Україна ⁶

НУХТ БТЕК 04.03.27 КР ПЗ

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата
Розроб.		Негретова В.В.		
Керівник		Красінько В.О.		
Консультант				
Зав.каф.		Стабніков В.В.		

**РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ
ОБЛАДНАННЯ
ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ
ПРОЦЕСІВ ТА**

Літ.	Арк.	Акрушів
	57	3
Кафедра БТМ		

Ф-9	Посівний апарат на 6 л	1	Ферментер на 6 л на замовлення. Максимальний температурний режим – 130 °С. Максимальна швидкість мішалки до 1500 об/хв. ТМ: «Infors». Країна: Україна ⁷
Н-10 Н-12 Н-14 Н-16	Насос перистальтичний	4	Перистальтичний насос МР-3118.6. Продуктивність до 56 л/год. Максимальний тиск 1,4 бар. ТМ: «DEBEM». Країна: Італія ⁸
Р-11	Реактор-змішувач на 15 л	1	Реактор РС-15. Об'єм – 15 л. Переносний. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Робочий тиск від -0,7 до +3 бар. Можливе підключення до СІР мийки. ТМ: «КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА». Країна: Україна ⁹
Р-13 Р-37 Р-39	Реактор-змішувач на 10 л	3	Реактор GSH-10. Об'єм – 10 л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Розмір (д×ш×в, мм): 620×650×860. ТМ: «HUIGON». Країна: Китай ¹⁰
Р-15	Реактор-змішувач на 25 л	1	Реактор на 25 л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Робочий тиск до 4 атм. Можливе підключення до СІР мийки. ТМ: «ХімМікс». Країна: Україна ¹¹
Ф-18	Інокулятор на 63 л	1	Ферментер на 63 л на замовлення. Максимальний температурний режим – 130 °С. Максимальна швидкість мішалки до 1500 об/хв. Розміри (в×д, мм): 990×450. ТМ: «Infors». Країна: Україна ⁷
Н-19 Н-23	Насос перистальтичний	1	Насос РТЛ13. Продуктивність від 49 до 344 л/год. Робоча температура до 135 °С. Робочий тиск до 4 бар. ТМ: «ТАПФЛО». Країна: Україна ¹²
Р-20	Реактор-змішувач на 150 л	1	Реактор на 150 л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Оснащений подвійною рубашкою. Має якорну мішалку. Можливе підключення до СІР мийки. ТМ: «Промвіт». Країна: Україна ¹³
Н-21 Н-25	Насос перистальтичний	2	Насос РТЛ13. Продуктивність від 49 до 344 л/год. Робоча температура до 135 °С. Робочий тиск до 4 бар. ТМ: «ТАПФЛО». Країна: Україна ¹²
Р-22	Реактор-змішувач на 80 л	1	Реактор на 80 л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Оснащений подвійною рубашкою. Має якорну мішалку. Можливе підключення до СІР мийки. ТМ: «Промвіт». Країна: Україна ¹⁴
Р-24	Реактор-змішувач на 200 л	1	Реактор на 200 л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Оснащений подвійною рубашкою. Розмір (д×ш×в, мм): 1021×1375×3050. Робочий тиск від -0,5 до +2,0 бар. Можливе підключення до СІР мийки. ТМ: «Промвіт». Країна: Україна ¹⁵
Ф-27	Інокулятор на 630 л	1	Ферментер на 630 л на замовлення. Максимальний температурний режим – 130 °С. Максимальна швидкість мішалки до 1500 об/хв. Розміри (в×д, мм): 1600×800. ТМ: «Infors». Країна: Україна ⁷
Н-28	Насос перистальтичний	1	Насос РТЛ17. Продуктивність від 129 до 908 л/год. Робоча температура до 135 °С. Робочий тиск до 4 бар. ТМ: «ТАПФЛО». Країна: Україна ¹²

P-29	Реактор-змішувач на 1000 л	1	Реактор на 1000 л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Оснащений подвійною рубашкою. Розмір (в×d, мм): 2180×1300. Робочий тиск від – 0,8 до +3,0 бар. Можливе підключення до СІР мийки. ТМ: «Промвіт». Країна: Україна ¹⁶
P-31	Реактор-змішувач на 630 л	1	Реактор на 630 л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Оснащений подвійною рубашкою. Розмір (в×d, мм): 1840×1140. Робочий тиск від -0,5 до +0,5 бар. Можливе підключення до СІР мийки. ТМ: «Промвіт». Країна: Україна ¹⁷
P-32	Реактор-змішувач на 1600 л	1	Реактор на 1600 л. Матеріал нержавіюча сталь AISI 316L. Оснащений подвійною рубашкою. Розмір (в×d, мм): 2480×1710. Робочий тиск від -0,9 до +2,0 бар. Можливе підключення до СІР мийки. ТМ: «Промвіт». Країна: Україна ¹⁸
H-30 H-33	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий EUROAQUA РКМ 60 S. Потужність двигуна 0,37 кВт. Матеріал корпусу – латунь. Ведучий вал зроблено з нержавіючої сталі. Робоча температура – 40 °С. ТМ: «Euroaqua». Країна: Польща ¹⁹
Ф-35	Ферментер	1	Ферментер на 5000 л. Оснащений автоматичним контролером подачі повітря, датчиками контролю рН та температури. Максимальна швидкість обертів мішалки 600 об/хв. Можливість підключення до СІР мийки. Розміри (в×d, мм): 4545×1400. ТМ: «Sysbiotech GmbH». Країна: Німечина ²⁰
H-36	Насос перистальтичний	1	Насос IP 400. Максимальний тиск до 13 бар. Матеріал корпусу – алюміній. Валу – нержавіюча сталь. Продуктивність від 1,1 до 5,2 м ³ /год. Максимальна робоча температура 71 °С. ТМ: «ELRO GmbH». Країна: Німечина ²¹

Примітка: 1 - <https://www.directindustry.com/prod/mann-hummel-vokes-air/product-63410-1670462.html>, 2 - <https://www.crownwell-compressor.com.ua/uk-%D0%BC%D0%B0%D1%81%D0%BB%D0%BE%D0%B7%D0%B0%D0%BF%D0%BE%D0%B2%D0%BD%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B9-%D0%B3%D0%B2%D0%B8%D0%BD%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%B8%D0%B9-%D0%BA%D0%BE%D0%BC%D0%BF%D1%80%D0%B5%D1%81%D0%BE%D1%80-cwd15a-ii-pm.html>, 3 - <https://tapflo.ua/ua/products-2/teploobmenniki#spetsialne-vikonannya>, 4 - <https://montajnik.com.ua/resiver-50-m3-davlenie-10-atm-iz-uglerodistoy-stali>, 5 - <https://sm-tools.com.ua/ua/p108764-filtr-tonkoy-ochistki-szhatogo-vozduha-omi-hf-0030-3-4-04a-0180-hg00-h-0000>, 6 - <https://selton.com.ua/uk/produkcija/filtry-hepa-ulpa/>, 7 - <https://unilab.kiev.ua/ru/catalog/fermentery-i-bioreactory/FermenteryTechforsInfors/>, 8 - https://www.debem.com.ua/nasos/peristalticheskie_nasosy/mp-3/, 9 - <http://www.kft2.com.ua/reaktor15.html>, 10 - <https://mromalls.com/stainless-steel-high-pressure-reactor/fixed-bed-continuous-stired-autoclave-reactor/>, 11 - <https://khimmix.ua/himicheskie-reaktory/reaktor-25l-s-propellernym-mikserom>, 12 - <https://tapflo.ua/products/hose-pumps/seriya-ptl#tekhichni-dani>, 13 - <https://promvit.com.ua/reaktor-630-l-dlya-myagkix-lekarstvennyx-form-2/>, 14 - <https://promvit.com.ua/reaktor-smesitel-obemom-80l/>, 15 - <https://promvit.com.ua/reaktor-rsg-200-dlya-peremeshivaniya-zhidkosti-obemom-200-l/>, 16 - <https://promvit.com.ua/reaktor-1000-l-dlya-prigotovleniya-siropov/>, 17 - <https://promvit.com.ua/reaktor-rabochim-obemom-630-l-dlya-myagkix-lekarstvennyx-form-asi-316-l/>, 17 - <https://promvit.com.ua/reaktor-2000-l-dlya-prigotovleniya-sgushhennogo-moloka/>, 18 - <https://prom.ua/ua/p1156252914-tsentrobezhnyj-nasos-370.html>, 19 - <http://sdlcentrifuge.ru/9-continuous-sterilization-system/192767/>, 20 - <https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-1000-5000l/>, 21 - https://mir-nasosov.com.ua/sites/default/files/1_1.pdf

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.

Технологічна схема культивування біомаси *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 включає допоміжні роботи (підготовка аераційного повітря, приготування та стерилізація поживних середовищ) та технологічний процес – підготовка посівного матеріалу та виробниче культивування біомаси *P. aureofaciens* ВКМ В-2501.

ДР 1. Підготовка та стерилізація аераційного повітря

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

Забір атмосферного повітря здійснюють за допомогою вертикальної труби з повітрезабірником (ПЗ-1) у найвищій точці приміщення Н = 8 м. Повітрезабірник обладнаний металевою сіткою для зменшення кількості забруднення, яке може попасти у систему повітрезабору.

ДР 1.2. Очищення від грубих домішок

Повітря із повітрезабірника потрапляє у фільтр грубої очистки (Ф-2) продуктивністю 5000 л/хв, де повітря більше ніж на 90% звільняється від забруднення.

ДР 1.3. Стиснення повітря

Із фільтра грубої очистки (Ф-2) повітря потрапляє у турбокомпресор (К-3) та стискається до тиску у 0,35 МПа. Стиснення повітря приводить до підвищення його температури до 120–200°C і збільшення вмісту вологи.

ДР 1.4. Охолодження повітря та виділення зайвої вологи

Повітря охолоджують та конденсують за допомогою теплообмінника-охолоджувача (Т-4). Щоб забезпечити випадання вологи повітря переохолоджують до температури 25–30°C та концентрації W= 60-70% та подають до ресиверу (Р-5).

ДР 1.5. Нагрівання повітря

Для забезпечення надійної роботи фільтрів другого та третього рівнів, повітря переохолоджують за допомогою теплообмінника (Т-6) до температури 45–50 °С

НУХТ БТЕК 04.03.27 КР ПЗ

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Негретова В.В.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ДОФЕРМЕНТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ ТА	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Красінько В.О.					60	12
Консультант						60		
Зав.каф.		Стабніков В.В.				Кафедра БТМ		

та вмісту вологи $W = 50\%$.

ДР 1.6 Очистка на головному фільтрі

Із теплообмінника (Т-6) повітря потрапляє на головний фільтр (Ф-7), який має ступінь очистки у 97%.

ДР 1.7 Очистка на індивідуальних фільтрах

Із головного фільтра повітря потрапляє на фільтри індивідуальної очистки (Ф-8, Ф-17, Ф-26, Ф-34), які встановлюються перед кожним апаратом.

ДР 2. Приготування та стерилізація титрувальних розчинів

ДР 2.1. Приготування 6 % розчину соляної кислоти для підкислення поживних середовищ

ДР 2.1.1. Приготування 6% розчину соляної кислоти для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 0,063 м³

Для 30 л поживного середовища потрібно використати 120 мл розчину 6%-ї соляної кислоти для його підкислення в посівному апараті об'ємом 0,063 м³.

Такий об'єм 6% розчину HCl готують так:

У колбу на 150 мл вносять 97 мл стерильної дистильованої води за допомогою мірного циліндра об'ємом 100 мл і додають, при перемішуванні, 23 мл концентрованої 31% соляної кислоти, яку відміряють мірним циліндром об'ємом 50 мл. Ретельно перемішують для кращого розведення речовин.

Контроль, що проводиться: Кх.

ДР 2.1.2. Приготування 6% розчину соляної кислоти для підкислення середовища в посівному апараті об'ємом 0,63 м³

Для 290 л поживного середовища потрібно використати 1160 мл розчину 6%-ї хлоридної кислоти для його підкислення в посівному апараті об'ємом 0,63 м³.

Розчин HCl готують у колбі об'ємом 2 л таким чином:

У колбу об'ємом 2 л вносять 935 мл стерильної дистильованої води за допомогою мірного циліндра об'ємом 1000 мл та додають 225 мл 31% соляної кислоти, яку відміряють мірним циліндром об'ємом 300 мл. Ретельно перемішують для кращого розведення речовин.

Контроль, що проводиться: Кх.

ДР 2.1.3. Приготування 6% розчину соляної кислоти для підкислення середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 5 м³

Для 3000 л поживного середовища потрібно використати 6000 мл розчину 6%-ї соляної кислоти для його підкислення у виробничому ферментері об'ємом 5 м³.

Розчин HCl готують у реакторі об'ємом 10 л таким чином:

У реактор (Р-37) об'ємом 10 л вносять 4840 мл дистильованої води та додають 1160 мл 36% соляної кислоти. Ретельно перемішують для кращого розведення речовин.

Контроль, що проводиться: Кх.

ДР 2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину натрію гідроксиду

ДР 2.2.1. Приготування і стерилізація 6% розчину натрію гідроксиду для підлучення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 0,063 м³

Для 30 літрів поживного середовища потрібно приготувати 120 мл розчину 6% NaOH для його підлучення в посівному апараті об'ємом 0,063 м³.

Для приготування 120 мл розчину 6% NaOH у колбу на 150 мл вносять 97 мл дистильованої води за допомогою мірного циліндра об'ємом 100 мл і додають, при перемішуванні, 23 мл 31% розчин гідроксиду натрію, який відміряють мірним циліндром об'ємом 50 мл і ретельно перемішують для кращого розведення та закривають ватно-марлевою пробкою.

Стерилізацію здійснюють в автоклаві при $t = 131$ °C і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ДР 2.2.2. Приготування і стерилізація 6% розчину натрію гідроксиду для підлучення поживного середовища у посівному апараті об'ємом 0,63 м³

Для 290 літрів поживного середовища потрібно приготувати 1160 мл розчину 6% NaOH для його підлучення в посівному апараті об'ємом 0,63 м³.

Для приготування 1160 мл розчину 6% NaOH у колбу на 2 л вносять 935 мл дистильованої води за допомогою мірного циліндра об'ємом 1000 мл і додають, при перемішуванні, 225 мл 31% розчин гідроксиду натрію, який відміряють мірним

циліндром об'ємом 300 мл і ретельно перемішують для кращого розведення та закривають ватно-марлевою пробкою.

Стерилізацію здійснюють в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ДР 2.2.2. Приготування 6% розчину натрію гідроксиду для підлучення поживного середовища для виробничого біосинтезу у ферментері об'ємом 5 м³

Для 3000 літрів поживного середовища потрібно приготувати 6000 мл розчину 6% NaOH для його підлучення у виробничому ферментері об'ємом 5 м³.

Для приготування 6000 мл розчину 6% NaOH у реактор (Р-39) об'ємом 10 л вносять 4840 мл стерильної дистильованої води та додають, при перемішуванні, 1160 мл 31% розчин гідроксиду натрію, ретельно перемішують для кращого розведення та закривають ватно-марлевою пробкою.

Стерилізацію здійснюють в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ДР 3. Приготування запасних розчинів мікроелементів

ДР 3.1 Приготування розчинів солей для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках

1,5 мг цитрату заліза (III) амонію та 9 мг цитрату гексагідрату хлориду кальцію зважують на електронних вагах, наважку поміщають у колбу об'ємом 50 мл та додають 20 мл дистильованої води. Ретельно перемішують для кращого розчинення солей.

Стерилізацію здійснюють в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ДР 4. Приготування і стерилізація поживних середовищ

Для культивування *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 використовується середовище такого складу (г/л):

- нафталін – 1

- глюкоза – 2
- трис – 6,06
- NaCl – 4,68
- KCl – 1,49
- NH₄Cl – 1,07
- Na₂SO₄ – 0,43
- MgCl₂×6H₂O – 0,2
- CaCl₂×6H₂O – 0,03
- Na₂HPO₄×12H₂O – 0,23
- FeNH₄ цитрат – 0,005 [2]

ДР 4.1. Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту у колбах на качалках

Оскільки для вирощування інокуляту у колбах на качалках об'єм поживного середовища становить 0,3 л, то всі компоненти розділяють на композиції та стерилізують в автоклаві.

ДР 4.1.1. Приготування та стерилізація композиції А

1,82 г трису, 1,4 г натрій хлориду, 0,45 г калій хлориду, 0,32 г хлорид амонію, 0,13 г сульфат натрію, 0,06 г гексагідрат хлориду магнію зважують на електронних вагах та вносять наважки в колбу об'ємом 500 мл та розчиняють їх у 120 мл води. Перемішують та закривають ватно–марлевим корком.

Стерилізацію здійснюють при $t = 131$ °С і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ДР 4.1.2 Приготування і стерилізація композиції Б

0,07 г гідрофосфату натрію дванадцятиводного зважують на електронних вагах та вносять наважку в колбу об'ємом 50 мл та розчиняють їх у 30 мл води. Перемішують та закривають ватно–марлевим корком.

Стерилізацію здійснюють при $t = 131$ °С і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ДР 4.1.3 Приготування і стерилізація композиції В

0,6 г глюкози зважують на електронних вагах та вносять наважку в колбу об'ємом 150 мл та розчиняють їх у 60 мл води. Перемішують та закривають ватно–марлевым корком.

Стерилізацію здійснюють при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску 0,05 МПа впродовж 30 хв.

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ДР 4.1.4 Приготування композиції Г

0,3 г нафталіну зважують на електронних вагах вносять, наважку в колбу об'ємом 150 мл та додають 90 мл дистильованої води. Ретельно перемішують для кращого розчинення нафталіну.

Контроль, що проводиться: Км.

ДР 4.2 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту P. aureofaciens ВКМ В-2501 в посівному апараті об'ємом 6 л

ДР 4.2.1. Приготування та стерилізація композиції А

18,18 г трису, 14,04 г натрій хлориду, 4,47 г калій хлориду, 3,21 г хлорид амонію, 1,29 г сульфат натрію, 0,6 г гексагідрат хлориду магнію, 0,09 г гексагідрат хлориду кальцію, 0,015 г цитрат заліза (III) амонію зважують на електронних вагах та вносять наважки у колбу об'ємом 3 л, додають 1,18 л дистильованої води.

Стерилізацію здійснюють в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ДР 4.2.2. Приготування та стерилізація композиції Б

0,96 г гідрофосфату натрію дванадцятиводного зважують на електронних вагах та вносять наважку в колбу об'ємом 750 мл та додають 0,3 л води. Перемішують та закривають ватно–марлевым корком. Стерилізацію здійснюють в автоклаві при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв.

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ДР 4.2.3. Приготування та стерилізація композиції В

6 г глюкози зважують на електронних вагах та вносять наважку в колбу об'ємом 1 л та додають 0,6 л води. Перемішують та закривають ватно–марлевым корком. Стерилізацію здійснюють в автоклаві при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску 0,05 МПа впродовж 30 хв.

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ДР 4.2.4 Приготування композиції Г

3 г нафталіну зважують на електронних вагах, вносять наважку в колбу об'ємом 2 л та додають 0,89 л дистильованої води. Ретельно перемішують для кращого розчинення нафталіну.

Контроль, що проводиться: Км.

ДР 4.3 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту P. aureofaciens ВКМ В-2501 в посівному апараті об'ємом 0,063 м³

ДР 4.3.1. Приготування та стерилізація композиції А

181,8 г трису, 140,4 г натрій хлориду, 44,7 г калій хлориду, 32,1 г хлорид амонію, 12,9 г сульфат натрію, 6 г гексагідрат хлориду магнію, 0,9 г гексагідрат хлориду кальцію, 0,15 г цитрат заліза (III) амонію, 6,9 г гідрофосфату натрію дванадцятиводного зважують на електронних вагах. Компоненти поміщають в реактор–змішувач (Р-11) об'ємом 15 л та розчиняють їх у 7,97 л дистильованої води, вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.1). Закривають кришку реактора та встановлюють режим перемішування близько 50-100 об/хв. Після повного розчинення компонентів, встановлюється режим стерилізації при $t = 131$ °С, рН = 7, і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв. Після закінчення стерилізації композицію за допомогою перистальтичного насоса (Н-12) переносять в стерильний інокулятор. Після змішування всіх композицій необхідно довести рН розчином гідроксиду натрію (від ДР 2.2.3) до досягнення рН 7.

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ДР 4.3.2 Приготування композиції Б

60 г глюкози зважують на електронних вагах, вносять наважку в збірник (Р-13) об'ємом 10 л та додають 5,9 л дистильованої води. Закривають кришку реактора та встановлюють режим перемішування близько 50-100 об/хв. Після повного розчинення компонентів, встановлюється режим стерилізації при $t = 112$ °С, і тиску 0,05 МПа впродовж 30 хв. Після закінчення стерилізації композицію за допомогою перистальтичного насоса (Н-14) переносять в стерильний інокулятор.

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ДР 4.3.3 Приготування композиції В

30 г нафталіну зважують на електронних вагах, вносять наважку в реактор (Р-15) об'ємом 25 л та додають 17,7 л дистильованої води. Ретельно перемішують при 50-100 об/хв для кращого розчинення нафталіну. Закривають кришку реактора та встановлюють режим перемішування близько 50-100 об/хв. Після закінчення перемішування композицію за допомогою перистальтичного насоса (Н-16) переносять в стерильний інокулятор.

Контроль, що проводиться: Км.

ДР 4.4 Приготування і стерилізація поживного середовища для вирощування інокуляту P. aureofaciens ВКМ В-2501 в посівному апараті об'ємом 0,63 м³

ДР 4.4.1. Приготування та стерилізація композиції А

Через об'ємно–ваговий дозатор в реактор–змішувач (Р-20) об'ємом 100 л поміщають 1,757 кг трису, 1,357 кг натрій хлориду, 432,1 г калій хлориду, 310,3 г хлорид амонію, 124,7 г сульфат натрію, 58 г гексагідрат хлориду магнію, 8,7 г гексагідрат хлориду кальцію, 1,45 г цитрат заліза (III) амонію, 66,7 г гідрофосфату натрію дванадцятиводного та розчиняють їх у 114,2 л дистильованої води, вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.2). Закривають кришку реактора та встановлюють режим перемішування близько 50-100 об/хв. Після повного розчинення компонентів, встановлюється режим стерилізації при $t = 131$ °С, рН = 7, і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв. Після закінчення стерилізації композицію за допомогою перистальтичного насоса (Н-21) переносять в стерильний інокулятор. Після змішування всіх композицій необхідно довести рН розчином гідроксиду натрію (від ДР 2.2.3) до досягнення рН 7.

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ДР 4.4.2 Приготування композиції Б

580 г глюкози зважують на електронних вагах, вносять наважку в збірник (Р-22) об'ємом 63 л та додають 57 л дистильованої води. Ретельно перемішують при 50-100 об/хв для кращого розчинення.

Стерилізацію здійснюють в реакторі при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску 0,05 МПа впродовж 30 хв. Потім розчин за допомогою перистальтичного насоса (Н-23) переносять в інокулятор (Ф-27) об'ємом 0,63 м³.

ДР 4.4.3 Приготування композиції В

290 г нафталіну зважують на електронних вагах, вносять наважку в реактор (Р-24) об'ємом 160 л та додають 171,4 л води. Ретельно перемішують при 50-100 об/хв для кращого розчинення нафталіну.

Потім розчин за допомогою перистальтичного насоса (Н-25) переносять в інокулятор (Ф-27) об'ємом 0,63 м³.

Контроль, що проводиться: Км.

ДР 4.5 Приготування поживного середовища для вирощування інокуляту P. aureofaciens ВКМ В-2501 у виробничому ферментері об'ємом 5 м³

ДР 4.5.1. Приготування композиції А

Через об'ємно-ваговий дозатор в збірник (Р-29) об'ємом 1000 л поміщають 18,18 кг трису, 14,04 кг натрій хлориду, 4,47 кг калій хлориду, 3,21 кг хлорид амонію, 1,29 кг сульфат натрію, 600 г гексагідрат хлориду магнію, 90 г гексагідрат хлориду кальцію, 15 г цитрат заліза (III) амонію, 690 г гідрофосфату натрію дванадцятиводного та додають 885 л дистильованої води, вносять 6%-ий розчин соляної кислоти (від ДР 2.1.3). Закривають кришку реактора та встановлюють режим перемішування близько 50-100 об/хв. Після повного розчинення компонентів, встановлюється режим стерилізації при $t = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, рН = 7, і тиску 0,15 МПа впродовж 40 хв. Після закінчення стерилізації композицію за допомогою перистальтичного насоса (Н-21) переносять в ферментер (Ф-35) об'ємом 5 м³. Після змішування всіх композицій необхідно довести рН розчином гідроксиду натрію (від ДР 2.2.3) до досягнення рН 7.

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ДР 4.4.2 Приготування композиції Б

Через об'ємно-ваговий дозатор в збірник (Р-31) об'ємом 630 л поміщають 6 кг глюкози л та додають 590 л дистильованої води. Ретельно перемішують при 50-100 об/хв для кращого розчинення.

Стерилізацію здійснюють в реакторі при $t = 112\text{ }^{\circ}\text{C}$ і тиску 0,05 МПа впродовж 30 хв. Потім розчин за допомогою перистальтичного насоса (Н-23) ферментер (Ф-35) об'ємом 5 м^3 .

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ДР 4.4.3 Приготування композиції В

Через об'ємно-ваговий дозатор в реактор-змішувач (Р-32) об'ємом 1600 л поміщають 3 кг нафталіну додають 1474 л води. Ретельно перемішують для кращого розчинення нафталіну.

Потім розчин за допомогою відцентрового насоса (Н-32) переносять в ферментер (Ф-35) об'ємом 5 м^3 .

Контроль, що проводиться: Км.

ТП 5. Підготовка посівного матеріалу *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501

ТП 5.1. Підтримання колекційної культури

Колекційну культуру *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 зберігають у чашках Петрі з м'ясо-пептонним агором з додаванням парів нафталіну. Пересіви здійснюють кожного місяця. Всі роботи з колекційною культурою проводяться строго в асептичних умовах.

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ТП 5.2. Одержання робочої культури

Культуру із ТП 5.1 пересівають петлею в чашки Петрі з м'ясо-пептонним агором з додаванням парів нафталіну та вирощують протягом 48 годин при температурі 28°C .

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ТП 5.3. Вирощування культури у пробірках з агаризованим середовищем

Робочу культуру із ТП 5.2 пересівають петлею в пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агором з додаванням нафталіну та вирощують протягом 48 годин при температурі 28°C .

Контроль, що проводиться: Кт, Км.

ТП 5.4. Вирощування в колбах на качалках

В асептичних умовах у колбу об'ємом 500 мл з стерильною композицією А (від ДР 4.1.1) зливають композиції Б, В, В (від ДР 4.1.2–4.1.4), перемішують і розливають по 150 мл у 2 качалочних колб об'ємом 750 мл.

У пробірки зі скошеним м'ясо-пептонним агором та культурою *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 вносять 5 мл фізіологічного розчину та змивають клітини.

Потім відбирають піпеткою суспензію клітин та переносять у колби з поживним середовищем і вирощують при $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 21 години.

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ТП 5.5. Вирощування посівного матеріалу в інокуляторі об'ємом 6 л

В попередньо простерилізований інокулятор об'ємом 6 л вносять композицію А об'ємом 1,2 л (від ДР 4.2.1), композицію Б об'ємом 0,3 л (від ДР 4.2.2), композицію В об'ємом 0,6 л (від ДР 4.2.3) та композицію Г об'ємом 0,9 л (від ДР 4.2.4) через засівну колбу додати посівний матеріал 300 мл (від ТП 3.4), включають перемішуючий пристрій (150–200 об/хв), аерацію та подають гарячу та холодну воду в сорочку інокулятора, подають аераційне повітря (від ДР 1.7).

Культивування проводять при $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 21 години. Відбір проб для здійснення мікробіологічного контролю та визначення біомаси проводять кожні 8 годин.

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ТП 5.6. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 0,063 м³

В стерильний інокулятор переносять композицію А об'ємом 9 л (від ДР 4.3.1) 6 л композиції Б (ДР 4.3.2) та 15 л композиції В (від ДР 4.3.3). За допомогою розчинів 6% соляної кислоти (від ДР 2.1.1) та 6% гідроксиду натрію (від ДР 2.2.1) стабілізують рівень рН у межах 7.

Після стабілізації рН в середовище вносять 3 л посівного матеріалу через трубу перетискування (від ТП 5.5), включають перемішуючий пристрій (150–200 об/хв), подають аераційне повітря (від ДР 1.7), гарячу та холодну воду в сорочку інокулятора.

Культивування проводять при $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 21 години. Відбір проб для здійснення мікробіологічного контролю та визначення біомаси проводять кожні 8 годин.

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ТП 5.7. Вирощування посівного матеріалу в посівному апараті об'ємом 0,63 м³

В простерилізований інокулятор переносять композицію А об'ємом 87 л (від ДР 4.4.1), 58 л композиції Б (ДР 4.4.2) та 145 л композиції В (від ДР 4.4.3). За допомогою розчинів 6% соляної кислоти (від ДР 2.1.2) та 6% гідроксиду натрію (від ДР 2.2.2) стабілізують рівень рН у межах 7.

Після стабілізації рН в середовище вносять 30 л посівного матеріалу через трубу перистальтичний насос (Н-19) (від ТП 5.6), включають перемішуючий пристрій (150–200 об/хв), подають аераційне повітря (від ДР 1.7), гарячу та холодну воду в сорочку інокулятора.

Культивування проводять при 28 °С протягом 21 години. Відбір проб для здійснення мікробіологічного контролю та визначення біомаси проводять кожні 8 годин.

Контроль, що проводиться: Кт, Кх, Км.

ТП 6. Виробничий біосинтез

*ТП 6.1. Промислове культивування *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 в виробничому ферментері об'ємом 5 м³*

У ферментер переносять композицію А об'ємом 927 л (від ДР 4.5.1), 596 л композиції Б (від ДР 4.5.2) та додають 1477 л композиції В (від ДР 4.5.3) із реактора. За допомогою розчинів 6% соляної кислоти (від ДР 2.1.2) та 6% гідроксиду натрію (від ДР 2.2.2) стабілізують рівень рН у межах 7.

Після стабілізації рН в середовище вносять 290 л посівного матеріалу через трубу перистальтичний насос (Н-28) (від ТП 5.7), включають перемішуючий пристрій (150–200 об/хв), подають аераційне повітря (від ДР 1.7), гарячу та холодну воду в сорочку інокулятора. Культивування проводять при 28 °С протягом 21 години. Відбір проб для здійснення визначення біомаси проводять кожні 8 годин. Вихід біомаси становить 10 г з 1 л середовища.

Після процесу культивування культуральну рідину *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 за допомогою перистальтичного насоса (Н-36) переносять у реактор для подальших процесів отримання препарату.

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА

7.1. Мікробіологічний контроль

Мікробіологічний контроль чистоти культури здійснюють двома шляхами:

1. прямим висівом на агаризовані поживні середовища;
2. мікроскопіюванням.

Прямий висів на агаризоване поживне середовище. Прямий висів здійснюють посівом культуральної рідини та проб готового посівного матеріалу методом виснажувального штриха до ізольованих колоній на чашки Петрі. Після розсівання здійснюють інкубування. Потім проводять мікроскопіювання мікроорганізмів з окремих колоній, які вирости на чашках Петрі за допомогою світлового мікроскопу [37].

Для приготування препарату «роздавлена крапля» на чисте, знежирене предметне скло за допомогою піпетки наносять маленьку краплю водопровідної води. Далі за дотримання асептичних умов бактеріологічною петлею у воду вносять невелику кількість культури мікроорганізмів, які вирости на чашках Петрі, розмішують та накривають покривним скельцем. При приготуванні препарату слід вносити невелику кількість мікроорганізмів та не допускати утворення бульбашок повітря під накривним склом, при надлишку води її необхідно видалити за допомогою фільтрувального паперу. Мікроскопіювання проводять за сухою системою [39].

Мікроскопіювання. За відсутності у зразку контамінації під час мікроскопіювання можна побачити клітини *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501. Бактерії мають поодинокі розташування і паличкоподібну форму, розміри клітин – $(0,6-0,9) \times (1,5-2,0)$ мкм, вони є рухливими, спор не утворюють, грамнегативні. При рості на м'ясо-пептонному агарі утворюють колонії – круглі, гладкі, випуклі, блискучі, слизисті, жовто-помаранчевого кольору, однорідної структури. Пігмент зелений, з часом дифундує в середовище [2].

					НУХТ БТЕК 04.03. КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Негретова В.В.			РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА ВИРОБНИЧОГО БІОСИНТЕЗУ.	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Красінько В.О.					72	9
Консультант						72		
Зав.каф.		Стабніков В.В.				Кафедра БТМ		

7.2. Показники росту і синтезу цільового продукту

7.2.1. Концентрація біомаси

Для визначення концентрації біомаси *Pseudomonas aureofaciens* використовують ваговий метод [40].

За допомогою центрифугування у попередньо зважених (відтарованих) центрифужних пробірках при 6000 об/хв протягом 15 хв здійснюють відділення клітинної маси від культуральної рідини.

Після відокремлення супернатанту декантацією центрифужні пробірки з біомасою висушують в сушильній шафі до постійної ваги при 105 °С. Після чого суху клітинну масу зважують на аналітичних вагах і знаходять за різницею мас центрифужних пробірок до і після центрифугування [41].

7.2.2. Концентрація джерела вуглецю і азоту

Визначення концентрації джерела Карбону та ступені деградації.

Для кількісного визначення концентрації нафталіну в поживному середовищі при вирощуванні бактерій *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 використовують газову хроматографію [5].

Принцип газової хроматографії полягає у розділенні, заснованому на розподілі компонентів суміші між двома фазами, одна з яких нерухлива (сорбент), а інша – рухлива (газ), що проходить через нерухливу фазу [38].

Нафталін у зразках проб культуральної рідини об'ємом 10 мл двічі екстрагували 5 мл н-гексану. Метаболіти нафталіну екстрагували трьома рівними об'ємами етилацетату. Екстракти сушили над безводним сульфатом натрію і випарювали азотним газом до об'єму 1 мл перед ГХ-аналізом.

Концентрацію нафталіну в пробах аналізували за допомогою газового хроматографу серії Varian CP-3800, оснащеного полум'яно-іонізаційним детектором і колонкою CP-Sil 8 CB 30. Товщина плівки 0,32 мкм і 0,25 м. Початкова температура колонки становила 50 °С, потім температура була підвищена з 50 до 250 °С, з підтримкою температури колонки на протязі 10 хв. Температура детектора та інжектора становили 300 та 250 °С відповідно.

Метаболіти нафталіну ідентифікували за допомогою газової хроматографії-мас-спектрометрії. Для ГХ-МС аналізу використовували зразок розміром 30 м × 0,25 мм. Капілярна колонка ТР-35МС з товщиною плівки 0,25 м використовується для поділу. В якості газа-носія використовували гелій, підтримуваний при потоці колонки 1,0 мл/хв (при тиску 105 кПа). А 1,0 л був введений зразок екстракту і колонку температуру підтримували при 60 °С протягом 2 хвилин з наступним програмуванням температури від 10 °С/хв до 160 °С протягом 2 хвилин. Температуру було підвищено до 240 °С зі швидкістю 5 °С/хв протягом 2 хвилин і, нарешті, до 290 °С зі швидкістю 30 °С/хв протягом 2 хв. Мас-спектрометр і лінія передачі проводилась при 290 °С [5].

Визначення концентрації джерела азоту.

Концентрацію амонійного азоту в культуральній рідині визначають за допомогою реактиву Несслера [42].

Метод Несслера ґрунтується на утворенні важкорозчинної забарвленої сполуки при взаємодії реактиву Несслера (K_2HgI_4) із аміаком при нейтральних або лужних розчинах:



Для визначення вмісту амонійного азоту спочатку культуральну рідину звільняють від клітин бактерій центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 15 хв після чого супернатант об'ємом 0,1 мл розводять в 100 разів. До 10 мл цього розчину додають краплю лугу (33%-го розчину КОН) і 0,5 мл реактиву Несслера. В якості контролю використовують дистильовану воду.

Оптичну густину вимірюють на фотоколориметрі КФК-2МП при довжині хвилі 400 нм (довжина оптичного шляху 10 мм). Концентрацію амонійного азоту розраховують за калібрувальним графіком [44].

7.3. Карта постадійного контролю

Таблиця 7.1

Карта постадійного контролю біосинтезу бактерій роду *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501

Назва стадії та номер точки контролю	Об'єкт контролю та показники які визначаються	Методи та засоби для контролю	Періодичність відбору проб та контролю	Значення показників
1	2	3	4	5
ДР 1 Підготовка аераційного повітря				
Кт 1.2 Грубе очищення повітря	Повітря на виході з фільтра, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря у фільтрі грубого очищення	E = 90 %, тиск згідно паспорту
Кт 1.3 Стиснення повітря	Стиснене повітря, температура, тиск	Манометр технічний, термометр	Після стиснення повітря	P= 0,35 МПа t = 120–200 °С
Кт 1.4 Охолодження повітря	Охоложене повітря, температура	Термометр технічний	Після охолодження повітря	t = 25–30 °С
Кт 1.4 Видалення зайвої вологи	Повітря після видалення зайвої вологи	Психрометричний метод	Після видалення зайвої вологи	W = 60 – 70 %
Кт 1.5 Нагрівання повітря	Нагріте повітря, температура	Термометр технічний	Після нагрівання повітря	t = 45 – 50 °С
Кт 1.6 Тонке очищення Повітря на головному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення, перепад тисків	Манометр, перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Після очистки повітря в фільтрі тонкого очищення	E = 97%

Кт 1.7 Очищення повітря на індивідуальному фільтрі	Очищене повітря, ступінь очищення	Перевірка ступеня очищення згідно паспорту фільтра	Під час очистки повітря на індивідуальному фільтрі	E = 99,99 %
ДР 2 Приготування тутрувальних розчинів				
Кх 2.1.1,2.1.2,2.1.3 Приготування 6 % розчину HCl для підкислення поживних середовищ	6% розчин соляної кислоти. Концентрація	Визначення концентрації	Не потребує стерилізації. Пробу відбирають відразу після приготування розчину	C=6%
Кт, Км, Кх 2.2.1, 2.2.2,2.2.3 Приготування і стерилізація 6% розчину NaOH для підлужнення поживних середовищ	6% розчин NaOH. Час, тиск, температура, концентрація, відсутність мікробіоти	Термометр, таймер, мікробіологічний контроль, манометр, визначення концентрації	Визначення температури та тиску відбувається постійно. Мікробіологічний контроль проводять після проведення стерилізації	P = 0,15 МПа t = 131°C T = 40 хв C = 6% Відсутність мікробіоти
ДР 3 Приготування запасних розчинів для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках				
Кт, Км 3.1 Приготування розчинів солей для вирощування посівного матеріалу у колбах на качалках	Цитрат заліза (III) амоній Гексагідрат хлориду кальцій Час, тиск, температура, концентрація, відсутність мікробіоти	Термометр, таймер, мікробіологічний контроль, манометр	Визначення температури та тиску відбувається постійно. Мікробіологічний контроль проводять після проведення стерилізації	P = 0,15 МПа t = 131°C T = 40 хв Відсутність мікробіоти

ДР 4 Приготування і стерилізація поживного середовища				
Кт, Км 4.1.1, 4.2.1 Приготування та стерилізація композицій А	Композиція А Температура, відсутність мікробіоти, час, тиск	таймер, мікробіологічний контроль, манометр, термометр	Визначення температури та тиску відбувається постійно. Мікробіологічний контроль проводять після проведення стерилізації	t= 131°C T= 40 хв P= 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.2, 4.2.2 Приготування та стерилізації композицій Б	Композиція Б Температура, відсутність мікробіоти, час, тиск	таймер, мікробіологічний контроль, манометр, термометр	Визначення температури та тиску відбувається постійно. Мікробіологічний контроль проводять після проведення стерилізації	t= 131°C T= 40 хв P= 0,15 МПа Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.1.3, 4.2.3 Приготування та стерилізація композицій В	Композиція В Температура, відсутність мікробіоти, час, тиск	таймер, мікробіологічний контроль, манометр, термометр	Визначення температури та тиску відбувається постійно. Мікробіологічний контроль проводять після проведення стерилізації	t= 112°C T= 30 хв P= 0,05 МПа Відсутність мікробіоти
Км 4.1.4, 4.2.4 Приготування композицій Г	Композиція Г Відсутність мікробіоти	мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять після проведення розчинення	Відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.3.1, 4.4.1 Приготування та стерилізація композицій А	Композиція А Температура, відсутність мікробіоти, час, тиск, рН	таймер, мікробіологічний контроль, манометр, термометр датчик рН	Визначення температури та тиску відбувається постійно. Мікробіологічний контроль проводять після проведення стерилізації	t= 131°C T= 40 хв P= 0,15 МПа рН = 7 Відсутність мікробіоти

Кт, Км 4.3.2, 4.4.2 Приготування та стерилізації композицій Б	Композиція Б Температура, відсутність мікробіоти, час, тиск	таймер, мікробіологічний контроль, манометр, термометр	Визначення температури та тиску відбувається постійно. Мікробіологічний контроль проводять після проведення стерилізації	t= 112°C T= 30 хв P= 0,05 МПа Відсутність мікробіоти
Км 4.3.3, 4.4.3 Приготування композицій В	Композиція В Відсутність мікробіоти	мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять після проведення розчинення	Відсутність мікробіоти
Кт, Км, Кх 4.5.1 Приготування та стерилізація композицій А	Композиція А Температура, відсутність мікробіоти, час, тиск, рН	таймер, мікробіологічний контроль, манометр, термометр датчик рН	Визначення температури та тиску відбувається постійно. Мікробіологічний контроль проводять після проведення стерилізації	t= 131°C T= 30 хв P= 0,15 МПа рН = 7 Відсутність мікробіоти
Кт, Км 4.5.2 Приготування та стерилізації композицій Б	Композиція Б Температура, відсутність мікробіоти, час, тиск	таймер, мікробіологічний контроль, манометр, термометр	Визначення температури та тиску відбувається постійно. Мікробіологічний контроль проводять після проведення стерилізації	t= 112°C T= 30 хв P= 0,05 МПа Відсутність мікробіоти
Км 4.5.2 Приготування композицій В	Композиція В Відсутність мікробіоти	мікробіологічний контроль	Мікробіологічний контроль проводять після проведення розчинення	Відсутність мікробіоти
ТП 5 Підготовка посівного матеріалу <i>Pseudomonas aureofaciens</i> ВКМ В-2501				
Кт, Км 5.1 Підтримання колекційної культури	Колекційна культура <i>Pseudomonas aureofaciens</i> ВКМ В-2501. Відсутність сторонньої мікробіоти. Морфологічна однорідність.	мікробіологічний контроль	Пересіви здійснюють кожний місяць	Відсутність мікробіоти

Продовження таблиці 7.1

<p>Кт, Км 5.2 Одержання робочої культури</p>	<p>Колекційна культура <i>Pseudomonas aureofaciens</i> ВКМ В-2501. Відсутність сторонньої мікробіоти, неконтрольованих мутацій, морфологічна однорідність</p>	<p>Таймер, термометр, камера Горяєва, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура контролюється під час культивування, мікробіологічний контроль проводять після культивування.</p>	<p>t= 28°C T= 48 год Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км 5.3 Вирощування культури у пробірках з агаризованим середовищем</p>	<p>Робоча культура <i>Pseudomonas aureofaciens</i> ВКМ В-2501. Відсутність сторонньої мікробіоти. Морфологічна однорідність.</p>	<p>Таймер, термометр, камера Горяєва, мікробіологічний контроль</p>	<p>Температура контролюється під час культивування, мікробіологічний контроль проводять після культивування.</p>	<p>t= 28°C T= 48 год Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 5.4. Вирощування культури в колбах на качалках</p>	<p>Посівний матеріал. Температура, рН, час вирощування, рівень рН частота обертів качалки, концентрація біомаси, чистота культури</p>	<p>Таймер, термометр, тахометр, датчик рН, мікробіологічний контроль, мікроскоп</p>	<p>Температура, рН та частота обертання контролюється автоматично, мікроскопіювання проводять кожні 8 годин.</p>	<p>t= 28°C T= 21 год рН = 7 С = 10 г/л W=150 – 200 об/хв Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 5.5. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 6 л</p>	<p>Посівний матеріал. Температура, рН, час вирощування, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, чистота культури</p>	<p>Таймер, термометр, тахометр, мікробіологічний контроль, датчик рН, газоаналізатор, мікроскоп</p>	<p>Температура, рН, рівень кисню та частота обертання контролюється автоматично, мікроскопіювання проводять кожні 8 годин</p>	<p>t= 28°C T= 21 год W=150 – 200 об/хв рН= 7 С = 10 г/л рО₂ = 4,5 л/хв Відсутність сторонньої мікробіоти</p>

Закінчення таблиці 7.1

<p>Кт, Км, Кх 5.6. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 0,063 м³</p>	<p>Посівний матеріал. Температура, рН, час вирощування, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, чистота культури</p>	<p>Таймер, термометр, тахометр, мікробіологічний контроль, датчик рН, газоаналізатор, мікроскоп</p>	<p>Температура, рН, рівень кисню та частота обертання контролюється автоматично, мікроскопіювання проводять кожні 8 годин</p>	<p>t= 28°C T= 21 год W=150 – 200 об/хв рН= 7 C = 10 г/л pO₂ = 45 л/хв Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
<p>Кт, Км, Кх 5.7. Вирощування культури в посівному апараті об'ємом 0,63 м³</p>	<p>Посівний матеріал. Температура, рН, час вирощування, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, чистота культури</p>	<p>Таймер, термометр, тахометр, мікробіологічний контроль, датчик рН, газоаналізатор, мікроскоп</p>	<p>Температура, рН, рівень кисню та частота обертання контролюється автоматично, мікроскопіювання проводять кожні 8 годин</p>	<p>t= 28°C T= 21 год W=150 – 200 об/хв рН= 7 C = 10 г/л pO₂ = 435 л/хв Відсутність сторонньої мікробіоти</p>
ТП 6 Виробничий біосинтез				
<p>Кт, Км, Кх 6.1. Промислове культивування <i>Pseudomonas aureofaciens</i> ВКМ В-2501 в ферментері об'ємом 5 м³</p>	<p>Культуральна рідина. Температура, рН, час вирощування, частота обертів мішалки, концентрація біомаси, мікробіологічна чистота культури</p>	<p>Таймер, термометр, тахометр, мікробіологічний контроль, датчик рН, газоаналізатор, мікроскоп</p>	<p>Температура, рН, рівень кисню та частота обертання контролюється автоматично, мікроскопіювання проводять кожні 8 годин</p>	<p>t= 28°C T= 21 год W=150 – 200 об/хв рН= 7 C = 10 г/л pO₂ = 4500 л/хв Відсутність сторонньої мікробіоти</p>

РОЗДІЛ 8. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ ВИРОБНИЦТВА

8.1. Системи знешкодження рідких відходів

До рідких відходів під час одержання біомаси *Pseudomonas aureofaciens* для біодеградації поліциклічних ароматичних вуглеводнів належать:

- відпрацьовані залишки мийних і дезінфікуючих засобів;
- відпрацьована вода для ополіскування обладнання.

Цільовим продуктом проєктованого виробництва є культуральна рідина, тому вона не відноситься до рідких відходів.

8.1.1. Система очищення стічних вод

Так як загальні витрати стічних вод не перевищують 100 м³/добу доцільно використовувати періодичний режим очищення стічних вод.

Для знешкодження даних відходів будемо використовувати аеротенк. Перед тим як відправляти на утилізацію дезінфікуючі розчини й миючі розчини їх необхідно розвести до менших концентрацій.

Стічну воду направляють у відстійник, куди для поліпшення осадження зважених часток можна подавати частину надлишкового мулу. Потім прояснена вода надходить у преаератор-усереднювач, у який направляють мул із вторинного відстійника. Тут стічні води попередньо аеруються повітрям протягом і 5-20 хв. У разі потреби в преаератор можуть бути введені нейтралізуючі добавки і живильні речовини. З усереднювача стічну воду подають в аеротенк, через який циркулює й активний мул. Біохімічні процеси, що протікають в аеротенку, можуть бути розділені на два етапи:

- адсорбція поверхнею активного мулу органічних речовин і мінералізація легко окислюваних речовин при інтенсивному споживанні кисню;
- доокислення органічних речовин, які повільно окисляються, регенерація активного мулу. На цьому етапі кисень витрачається повільніше.

НУХТ БТЕК 04.03.27 КР ПЗ

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Негретова В.В.			РОЗДІЛ 8. АНАЛІЗ ПЕРСПЕКТИВ ВПРОВАДЖЕННЯ СИСТЕМИ ЕКОЛОГІЗАЦІЇ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Красінько В.О.					81	5
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.В.						

Як правило, аеротенк розділений на дві частини: регенератор (25% від загального обсягу) і власне аеротенк, у якому йде основний процес очищення. Наявність регенератора дає можливість очищати більш концентровані стічні води і збільшити продуктивність агрегату. Перед аеротенком стічна рідина повинна містити не більш 150 мг/л зважених часток і не більш 25 мг/л нафтопродуктів. Температура вод, що очищаються, не повинна бути нижче 6 °С и вище 30 °С, а рН – у межах 6,5...9. Після контактування стічна вода з мулом надходить у вторинний відстійник, де відбувається відділення мулу від води. Більшу частину мулу повертають в аеротенк, а його надлишок направляють у преаератор.

Аеротенк являє собою відкритий басейн, обладнаний пристроями для примусової аерації. Вони бувають двох-, трьох-, і чотирьохкоридорні. Глибина аеротенків від 2 до 5 метрів.

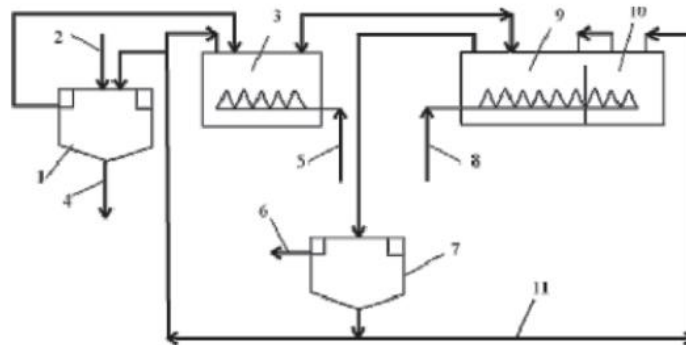


Рис 8.1 1 – Схема установки для біологічного очищення стічних вод: 1- первинний відстійник; 2 - вхідні стічні води на очищення; 3 - преаератор; 4 - осад; 5, 8 - повітря; 6 - очищені стічні води; 7 - вторинний відстійник; 9 - аеротенк; 10 - регенератор; 11 – активний мул [45].

8.2. Системи знешкодження газоподібних відходів

Газоподібні відходи формуються на доферментаційних стадіях в посівних апаратах та під час ферментації. Газоподібні відходи в своєму складі мають аерозоль бактеріальних спор та вуглекислий газ.

Процес отримання посівного матеріалу *Pseudomonas aureofaciens* становить 21 год на всіх стадіях, вирощування посівного матеріалу відбувається в посівних апаратах об'ємами 6 л, 0,063 м³ та 0,63 м³ та в виробничому ферментері об'ємом 5 м³.

Під час вирощування культури аерація відбувається з однаковою швидкістю 1,5 л/(л·хв), отже кількість газоподібних відходів буде становити:

$$(3 + 30 + 290 + 3000) \cdot 1,5 \text{ л/(л·хв)} \cdot 21 \text{ год} \cdot 60 = 6\,280\,470 \text{ л} = 6\,280,47 \text{ м}^3.$$

8.2.1. Утилізація газоподібних відходів

Для очищення та знешкодження повітря перед викидом в атмосферу на проєктованому виробництві будемо використовувати мокре очищення газів.

Процес мокрого пиловловлювання ґрунтується на контакті насиченого пилом газового потоку з рідиною (барботажі). Внаслідок контакту з рідиною частинки пилу осаджуються на поверхню рідини та виносяться з апарата у вигляді шламу. Осадження частинок пилу на поверхню рідини відбувається під дією сил інерції та броунівського руху.

Сили інерції, що діють на частинки пилу й краплини рідини при їх зближенні, залежать від маси частинок й краплинок та швидкості їх руху. Частинки пилу менше 1 мкм не мають достатньої кінетичної енергії і при зближенні обгинають краплинки, тобто не вловлюються рідиною. Броунівський рух характерний для частинок менших 1 мм.

Значної ефективності очищення газових викидів від пилу за рахунок броунівського руху можна досягти шляхом зменшення швидкості руху газового потоку в апараті.

Абсорбція – фізичне розчинення абсорбентного компонента в розчині, при якому не відбувається хімічна реакція.

Пилоочищення рідиною реалізується в мокрих газопромивачах та барботажних скруберах. Їх перевага полягає:

- в невеликій вартості при високій ефективності ;
- в можливості очищення газів при високій температурі та вологості вловлюваного пилу а також при небезпеці загорань і вибухів очищених газів;
- в можливості разом з пилом вловлювати пароподібні та газоподібні компоненти;
- в можливості очищення газів від частинок розміром до 0,1 мкм;

– в значній продуктивності, що знаходиться в межах 100...200 тис.м³/год [46].

Тарілчасті газопромивачі є вертикальними порожнистими циліндрами, всередині яких встановлені горизонтальні перегородки з отворами (тарілки).

Залежно від швидкості газу можливі три режими роботи тарілчастого газопромивача:

- барботажний, при якому газ проникає в шар рідини у вигляді бульбашок (швидкість газу до 1 м/с);
- пінний, при якому утворюється високотурбулізована піна (швидкість газу понад 1,2 м/с);
- хвильовий, при якому газ проходить через шар води струменями (швидкість газу понад 2,0 м/с).

Барботажний режим унаслідок невеликих швидкостей газу, що знижує продуктивність газопромивача, має обмежене застосування. В барботажному режимі ускладнено також видалення шламу з решітки, що створює складності при експлуатації пилоуловлювача (засмічення решітки шламом, збільшення гідравлічного опору апарату та ін.).

У *пінному* режимі відбувається безперервне утворення, руйнування і злиття бульбашок, що інтенсифікує уловлювання пилу і сприяє внаслідок турбулізованому стану піни динамічному змиттю шламу з решітки. Тарілчасті пилоуловлювачі, що працюють в пінному режимі, називають також пінні газопромивачі. В пінних тарілчастих пилоуловлювачах можливо ефективно уловлювання частинок більше 2 мкм. Витрата води складає 0,4-0,9 кг/м³.

Для *хвильового* режиму характерна гідравлічна нестабільність роботи апарату: прорив газу через шар води на решітці, порушення сходу шламу через решітку, збільшення шару води, що підвищує гідравлічний опір, підвищений краплинний та ін.

В пилоуловлювачах з переливними тарілками (див. рис. 8.2.1) зазвичай встановлюють дірчасті тарілки з діаметром отворів 2-8 мм. Швидкість газу у вільному перерізі апарату 1-3 м/с. Основний режим роботи газопромивача з переливними тарілками – пінний.

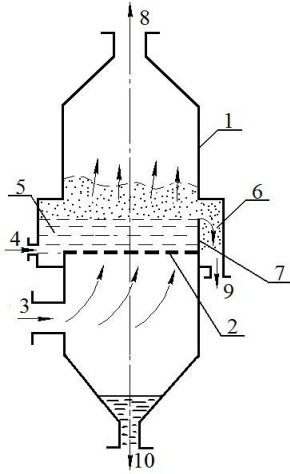


Рис. 8.2 Схема газопромивача з переливними тарілками: 1 – корпус газопромивача; 2 – тарілка; 3 – подача запиленого газу; 4 – подача води; 5 – приймальна камера; 6 – зливна камера; 7 – поріг регулюючий рівень води на тарілці; 8 – вихід очищеного газу; 9 і 10 – відвід шламу.

8.3. Системи знешкодження твердих відходів

До твердих відходів виробництва належать:

- пакувальні матеріали (картон, полівінілхлорид, поліетилен);
- скло (у результаті склобою лабораторного посуду);
- засоби індивідуального захисту;
- використані ганчірки;
- бруд на фільтрах;
- непридатні хімічні реактиви (порошки для приготування м'ясо-пептонного агару, якщо термін придатності збіг, агаризовані середовища з чашок Петрі після мікробіологічного контролю, випадково розсипані солі при приготуванні поживних середовищ, титрувальні агенти (соляна кислота та натрій гідроксид)).

8.3.1. Утилізація твердих відходів

Пакувальні відходи, скло, засоби індивідуального захисту та використані ганчірки необхідно помістити в контейнер із зазначенням на кришці вмісту та передавати на переробку до пунктів прийому вторсировини.

Бруд на фільтрах, що може залишатися після культивування *Pseudomonas aureofaciens*, необхідно піддати термічній обробці в убойному автоклаві і передати організаціям, які приймають фільтри на утилізацію.

Непридатні хімічні реактиви варто зберігати окремо в спеціально відведеній і промаркованій шафі, а потім передати спеціальним організаціям на утилізацію.

Агаризовані середовища з чашок Петрі з вирослими колоніями попередньо інактивувати в убойному автоклаві.

РОЗДІЛ 9. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА

Перелік нормативно-технічної документації та науково-технічної літератури, яку можна використовувати під час проектування виробництва та у технологічному процесі:

ДСТУ

1. ДСТУ ISO 9001:2015 Системи управління якістю. Вимоги. – К. ДП «УкрНДНЦ», 2016.
2. ДСТУ 14001:2015 Системи екологічного управління. Вимоги та настанови щодо застосування. – К. ДП «УкрНДНЦ», 2016.
3. ДСТУ 50001:2020 Системи енергетичного менеджменту. Вимоги та настанова щодо використання. - К. ДП «УкрНДНЦ», 2020.
4. ДСТУ 45001:2019 Системи управління охороною здоров'я та безпекою праці. Вимоги та настанови щодо застосування. - К. ДП «УкрНДНЦ», 2019.
5. ДСТУ Б А.2.4-22:2008 Технологія виробництва. Основні вимоги до робочих креслень. – К. Мінрегіонбуд України, 2009.

Інша нормативно-технічна документація

6. ДБН В.1.1-7:2016 Пожежна безпека об'єктів будівництва. Загальні вимоги. – К. Міністерство регіонального розвитку, будівництва та житлово-комунального господарства України, 2017.

Методичні рекомендації, конспекти лекцій, лабораторні практикуми

7. Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. / уклад. Т.П. Пирог, Л.В. Ключка. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.

НУХТ БТЕК 04.03.27 КР ПЗ

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Негретова В.В.			РОЗДІЛ 9. НОРМАТИВНО-ТЕХНІЧНА ДОКУМЕНТАЦІЯ, ВИКОРИСТАНА ПІД ЧАС ПРОЕКТУВАННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Красінько В.О.					86	2
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.В.				86		

8. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
9. Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. – К.: НУХТ, 2009. – 336 с.
10. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв: Конспект лекцій для студентів напряму 6.051401 «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання Київ НУХТ, 2013. – 143 с.
11. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Філяк О., Сибірний А., Юрим М., Біодеградація нафтопродуктів у навколишньому природному середовищі. *Вісник Львів. Серія біологічна*. 2008. Вип. 47. С. 89-95
2. Патент №1
3. Yu S.H., Ke L., Wong Y.S., Tam N.F.Y. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments// *Environment International*, 2005. – с. 149 – 154 doi: 10.1016/j.envint.2004.09.008
4. Павленко М.І., Сорока Я. М., Гвоздюк П.І., Кухар В.П. «Біодеструкція поліциклічних ароматичних вуглеводнів» *Каталіз и нефтехимия*, 2007, №15
5. Chen Lin, Li Gan, Zu-Liang Chen Biodegradation of naphthalene by strain *Bacillus fusiformis* (BFN) *Journal of Hazardous Materials*, 2010: 771-777 doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.06.101
6. Premnath, N., Mohanrasu, K., Guru Raj Rao, R., A crucial review on polycyclic aromatic Hydrocarbons - Environmental occurrence and strategies for microbial degradation. *Chemosphere*, 2021, 280, 130608. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130608
7. Balaram Mohapatra and Prashant S. Phale Microbial Degradation of Naphthalene and Substituted Naphthalenes: Metabolic Diversity and Genomic Insight for Bioremediation, 2021 doi: 10.3389/fbioe.2021.602445
8. Samuel Baron. *Medical Microbiology*, 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996 – 1273 pages.
9. Патент №2
10. Патент №3
11. В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев наукова думка. 1990. 6-7 ст.
12. Под. ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, с. Уильямса. М.: Определитель бактерий Берджи.: Пер. с англ. / Мир.1997. –Том 1, 2.

13. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Pathway Database. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ppun00626
14. Пирог Т.П., Ключка Л.В. Біохімічні основи мікробного синтезу [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» – К.: НУХТ, 2019. – 81 с.
15. Пирог Т.П., Пенчук Ю.М. Біохімічні основи мікробного синтезу: підручник / – К. :Ліра-К, 2019. – с. 28-63.
16. Пирог, Т.П. Загальна мікробіологія: підручник, 2-е вид., доп. і перероб. – К. :НУХТ, 2010. – с. 402-416.
17. Герасименко В.Г., Герасименко М.О., Цвіліховський М.І. Біотехнологія: Підручник – К.: Фірма «ІНКОС», 2006. — 647 с.
18. Електронний ресурс №1
19. Industrial-scale bioreactor 1000-5000L – [Електронний ресурс] Режим доступу: <https://en.sysbiotech.at/industrial-scale-bioreactor-1000-5000l/>
20. Карлаш Ю.В., Омельчук Є.О. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О.Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.
21. Дезінфікуючий засіб Дезактін 1 кг [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p28668985-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-dezaktin.html?&primelead=Ml4xNQ>
22. Велідез (з ензимами), 1 л [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1798480518-velidez-enzimami.html>
23. Біолонг "Універсальний", 5 л. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1217855522-sredstvo-universalnyj-biolong.html?&primelead=Ml42ODc1>

24. Засіб дезінфекційний мийний MDM Чистолاین-Універсал 1 л [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1802597318-sredstvo-dezinfektsionnoe-moyuschee.html>
25. Дезінфікуючий засіб для обробки обладнання та приміщень Дезосепт Форте 22кг. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p1173716072-dezinfitsiruyuschee-sredstvo-dlya.html?&primelead=M14xNQ>
26. Біомой 1 кг - миючий, дезінфікуючий засіб. [Електронний ресурс] / Режим доступу: <https://prom.ua/ua/p3538341-biomoj-moyuschee-dezinfitsiruyuschee.html?&primelead=M14xNQ>
27. Костюченко Н.І. Біотехнологічні аспекти раціонального природокористування: навчальний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра напряму підготовки «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування» / Н.І. Костюченко. – Запоріжжя: ЗНУ, 2018. – 116 с.
28. Етапи біотехнологічного процесу. [Електронний ресурс] / Режим доступу: https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php/236896/mod_resource/content/1/3.pdf
29. Юлевич О. І. Загальна біотехнологія. Методичні рекомендації для самостійного вивчення дисципліни і виконання лабораторно-практичних робіт студентами денної форми навчання напряму підготовки 6.051401- "Біотехнологія" – Миколаївський національний аграрний університет, 2015. – 157 с.
30. Данилов І. П., Самійленко С. І. Апарати мікробіологічної промисловості: навч. посібник /– Харків : НТУ «ХП», 2008. – 272 с.
31. Prakash, O., Nimonkar, Y., & Desai, D. (2020). A Recent Overview of Microbes and Microbiome Preservation. *Indian Journal of Microbiology*, 60(3), 297–309. doi:10.1007/s12088-020-00880-9
32. Wolf, J., & Langergraber. Microbiology preservation techniques. *Journal of microbiological methods*, 2004, 58(1), 1-26.
33. Мацай Н. Ю. Основи біотехнології : підручник для студ. освітнього рівня бакалавр спец. «Біологія» / – Луганськ : Держ. закл. «Луган. нац. ун-т імені

- Тараса Шевченка». – Луганськ : Вид-во ДЗ «ЛНУ імені Тараса Шевченка», 2011. – 153 с.
34. Richard H. Baltz, Julian Davies, Arnold L Demain. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology", 2010 – 784.
35. Гуляєв В.М. Конспект лекцій з дисципліни “ Устаткування виробництва”. Для здобувачів вищої освіти бакалаврського рівня зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія». Кам’янське: ДДТУ, 2019. – 58с.
36. Emblem A. Plastics properties for packaging materials. *Packaging Technology*, 2012,287–309. doi:10.1533/9780857095701.2.287
37. Dean D.A., Evans E.R., Hall I.H. Pharmaceutical Packaging Technology (1st ed.), 2000 – 646. doi: <https://doi.org/10.1201/b12651>
38. Красінько В.О. Методи контролю біотехнологічних, фармацевтичних і харчових виробництв [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобув. освіт. ступ. «бакалавр» спец. 162 «Біотехнології та біоінженерія» освіт.-проф. програми «Біотехнологія» ден. і заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К.: НУХТ, 2019. – 252 с.
39. Пирог Т.П., Ключка Л.В. Загальна мікробіологія і вірусологія: [Електронний ресурс] лабораторний практикум для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнології: фармацевтична, промислова, харчова, природоохоронна» денної форми навчання. – К.: НУХТ, 2021. – 100 с.
40. [Електронний ресурс №2] Режим доступу: https://cyberleninka.ru/article/n/poluchenie-bakterialnoy-suspensii_pseudomonas-aureofaciens-2006-na-melasse-i-izuchenie-nekotoryh-ee-svoystv/viewer
41. [Електронний ресурс №3] Режим доступу: https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/46720
42. Малащенко Ю.Р., Пирог Т.П., Романовська В.А. Пошук метанотрофних продуцентів екзополісахаридів. Прикладна біохімія та мікробіологія: 2001, Том 37, № 6. – С. 702-705

43. Прищеп Т.П., Чучалін В.С., Зайков К.Л. та ін. Основи фармацевтичної біотехнології. Фенікс, 2006. – 251 с.
44. [Електронний ресурс №4] Режим доступу: http://elib.sfukras.ru/bitstream/handle/2311/33687/diplombubnova_0.pdf?sequence
45. Біологічне очищення стічних вод. [Електронний ресурс]/ Режим доступу: <https://conf.ztu.edu.ua/wp-content/uploads/2021/05/56-1.pdf>
46. Ратушняк Г. С., Лялюк О. Г. Р 25 Засоби очищення газових викидів. Навчальний посібник. – Вінниця: УНІВЕРСУМ-Вінниця, 2008. – 207 с.
47. Гічов Ю.О. Очищення газів. Частина I: Конспект лекцій. - Дніпропетровськ: НМетАУ, 2015. – 51 с.

ДОДАТКИ

RU 2398 339 C2

неселективних умовах після 7 пасажів становить близько 50%.

Заздалегідь не можна було очікувати, що при отриманні пропонуваного бактеріального штаму *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 Д обидві плазміди будуть стабільно підтримуватись у клітині, оскільки стабільність підтримки плазмід та експресія плазмідних генів залежить від видової приналежності бактеріального штаму. I.F., Filonov A.E., Kochetkov V.V., Boronin A.M.

Селективні умови вирощування.

Штам бактерій *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 Д у присутності важких металів вирощують у синтетичному трис-мінеральному середовищі наступного складу, г/л: трис - 6,06, NaCl - 4,68, KCl - 1,49, NH₄Cl - 1,07, Na₂SO₄ - 0,43, MgCl₂·6H₂O - 0,2, CaCl₂·2H₂O - 0,03, Na₂HPO₄·12H₂O - 0,23, FeNH₄(C₂H₃O₂)₃·5H₂O - 5 мг/л, цитрат 5 мг/л, рН 7 (Mergeay M., Nies D., Schlegel H.G., Gerits J., Charles P., Van Gijsegem F. *Alcaligenes eutrophus* CH34 є факультативним chemolithotroph з plasmid-bound resistance до твердих металів. *J. Bacteriol.* 1985). 162. P.328-334).

Як джерело вуглецю та енергії в середу додають глюкозу (2 г/л) або нафталін (1 г/л). Трис-мінеральне середовище, що містить мінімальну кількість фосфат-аніонів і трис, використовується для запобігання преципітації Co²⁺ та Ni²⁺ та підтримки рН середовища відповідно. Розчини металів у вигляді хлориду кобальту (CoCl₂·6H₂O) і нікелю хлориду (NiCl₂·6H₂O), і сульфату кобальту (CoSO₄·xH₂O) і сульфату нікелю (NiSO₄) додають у середу в концентрації від 20 мкМ до 2.

Умови зберігання.

Штам бактерій *Pseudomonas aureofaciens* ВКМ В-2501 Д зберігають на чашках з трис-мінеральним середовищем з додаванням нікелю (100 мкМ) і нафталіну (пари). Пересів на свіжі середовища один раз на місяць. Зазначений штам може зберігатися не менше 1 року в 15% гліцерині при -20°C, не більше 5 років під вазеліновим маслом у напіврідкому середовищі наступного складу: поживний бульйон (Difco, США)-4 г/л, NaCl-5 г/л, агар - 6 г/л, рН 6,8.

minerals, and amino acids, which are required for the bacterial cell growth and synthesis of enzymes [11].

Bacteria that are capable to degrade oil components have been known since early twentieth century and they are mainly isolated from oil contaminated soil or sediments. Some of these bacteria were able to degrade PAHs [2]. This study described the isolation of a Gram-negative bacterial isolate DRK 9.1 from volcanic mud at the former oil drilling site at Renokenongo Village, Sidoarjo. This bacterial isolate was selected because it displayed hydrocarbon-degrading ability of 1 % diesel fuel in Bushnell-Haas medium while other isolates from the former oil drilling site did not grow on 1 % diesel fuel. The bacteria was tested for degradation of naphthalene, because naphthalene is a PAH compound that presents in many environments. This work targets its application in bioremediation of PAHs in the environment.

MATERIALS AND METHOD

Microorganism and Growth Media

The bacterial isolate DRK 9.1 was obtained from a mud sample in Renokenongo Village, Sidoarjo. For growth media and enumeration, Nutrient Broth (NB, Merck), Nutrient Agar (NA, Merck) and Cetrimide Agar (Himedia) were used. All the media used were prepared in distilled water, according to the manufacturer's direction. Bushnell-Haas medium (BH) added with 0.02 % (w/v) naphthalene and 0.5 % (w/v) yeast extract (Difco) were used for analysis of naphthalene degradation. The Bushnell-Haas medium was prepared according to Atlas with some modification [12]. The medium contained 1 g L⁻¹ NH₄NO₃, 0.05 g L⁻¹ FeCl₃, 1 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0.02 g L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.2 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, and 0.5 % (w/v) yeast extract. The medium was sterilized in an autoclave for 15 min at 15 psi pressure, 121 °C. After sterilization, 0.02 % (w/v) naphthalene was added aseptically.

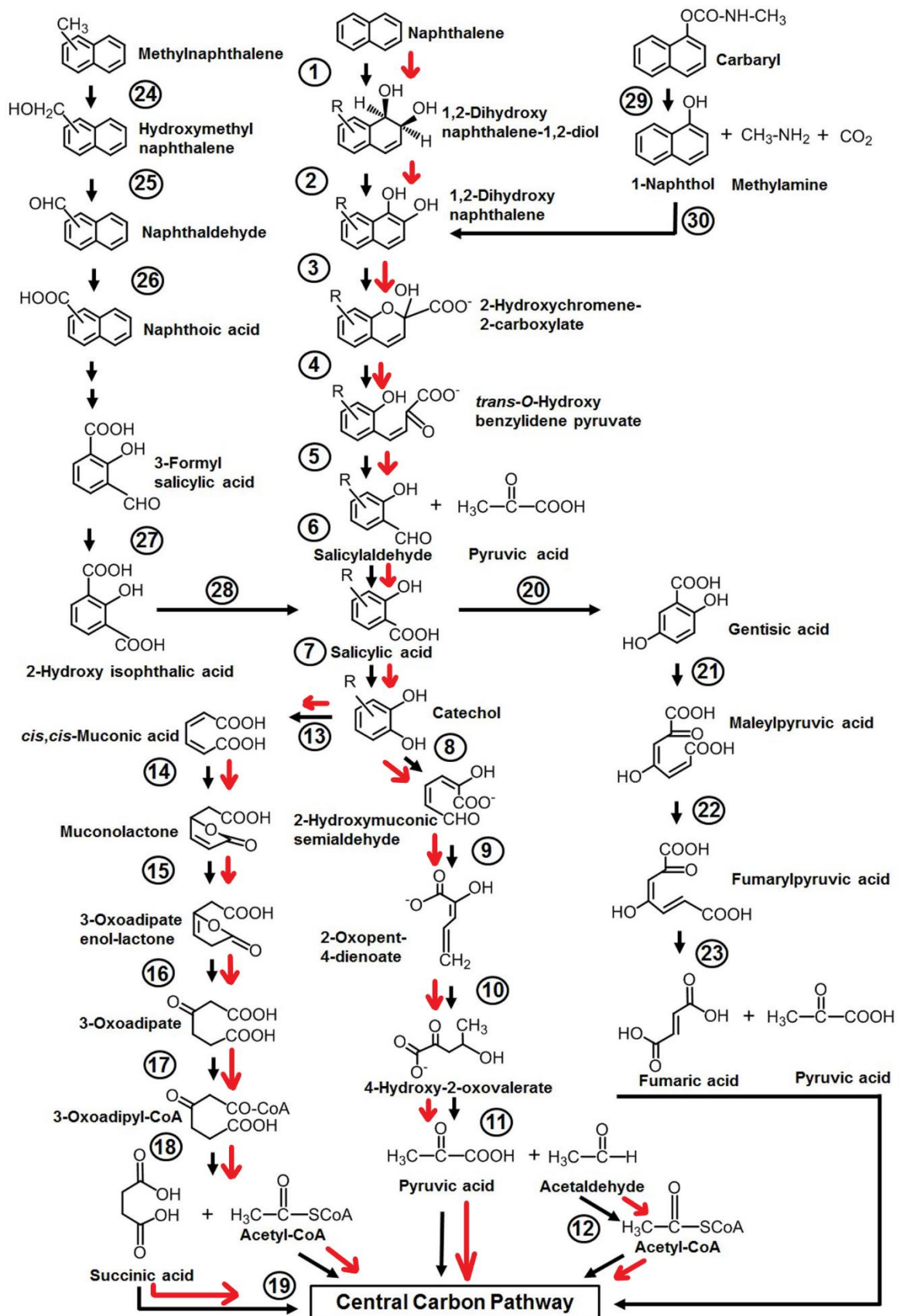
Isolation of Bacterial Isolate

Isolation of bacterial isolates was carried out by enrichment of volcanic mud samples in BH medium added with 1 % (v/v) diesel fuel as a carbon source according to Toledo et al. [9] with some modification. Three grams of volcanic mud was inoculated in 20 mL BH medium added with 1 % diesel fuel and was incubated for 14 days in a shaker incubator at 60 rpm, with sub-culturing at day-7. For isolation, a serial dilution in sterile water was carried out. Individual colonies were picked up using sterile inoculation loop and transferred into another NA plate using quadrant streak method for purification.

Characterization of Bacterial Isolate DRK 9.1

Morphological characteristics of isolate DRK 9.1 after 24 h included colony shape, elevation, margin, color, consistency, and pigmentation were observed as described by Harley and Prescott [13]. Colony color was based on the Faber Castle polychromos color chart. Morphological characteristic was determined using Gram staining as described [13]. Biochemical tests carried out to characterize the isolate DRK 9.1 were the motility test, aerobic-anaerobic growth test, catalase test, oxidase test, glucose fermentation test with Glucose Phenol Red Broth, and oxidation-fermentation test with Hugh-Leifson medium. All biochemical tests were conducted according to Barrow

Шлях катаболізму нафталіну у *Ps. putida* NBRC 14164



Для розвитку будь-якого мікроорганізму існують певні температурні та рН оптимуми, за яких забезпечується його максимальне зростання, вихід цільового продукту тощо. Температурні кордону більшість видів псевдомопад досить широкі (443°C). Багато видів цього роду є мезофілами і розвиваються при 27-30 ° C (Хоулт Д. з співавт., 1997). Для досліджуваного штаму псевдомонад раніше дані параметри були вивчені, тому було розглянуто температурні режими: 20, 25 і 30°C умовах глибинного культивування бактерії на мінеральному середовищі з додаванням 2 г/л глюкози. При температурі 25°C рівень мікробної маси перевищив значення інших варіантів практично вдвічі і становив $10,9 \pm 1,1$ г/л. В умовах поверхневого культивування були розглянуті температурні режими: 4, 20, 30 та 41°C. При цьому зростання бактерій *P. vitreofaciens* значно відрізнялося. Найбільш ясне однорідне зростання бактерії по всьому штриху відзначено при 30°C. На другу добу культивування спостерігалася поява пігменту темно-жовтогогарячого кольору, колонії мали більш щільну консистенцію з вираженим слизоутворенням. При температурі 4 та 41°C розвиток бактерії практично не спостерігалось. Оптимальним рН для бактерій роду *Pseudomonas* є інтервал від 4,5 до 7,5 (Нетрусов А. І. з співавт., 2004; Yang G. et al., 2013). У досліджах використовувалася оптимізована за джерелами азоту та вуглецю мінеральне середовище зі значеннями рН від 4,5 до 7,5 з інтервалом 0,5. У всіх випадках максимум даного значення зафіксований на 19 і 21-й годині культивування. Мінімальний приріст біомаси відмічений при кислих значеннях рН і становив у середньому $5,1 \pm 0,9$ г/л, що на 43% менше від максимально отриманого результату. При нейтральному значенні рН рівень біомаси в 9 разів перевищив початковий рівень і становить $10,8 \pm 0,4$ г/л. Отриманий результат узгоджується з літературними даними, т.к. нейтральне значення рН найбільш сприятливо для роботи ферментних систем та розвитку бактерій (Клесов А. А., 1984; Березовська В. А. з співавт., 2006; Моргун В. В. з співавт. 2009).